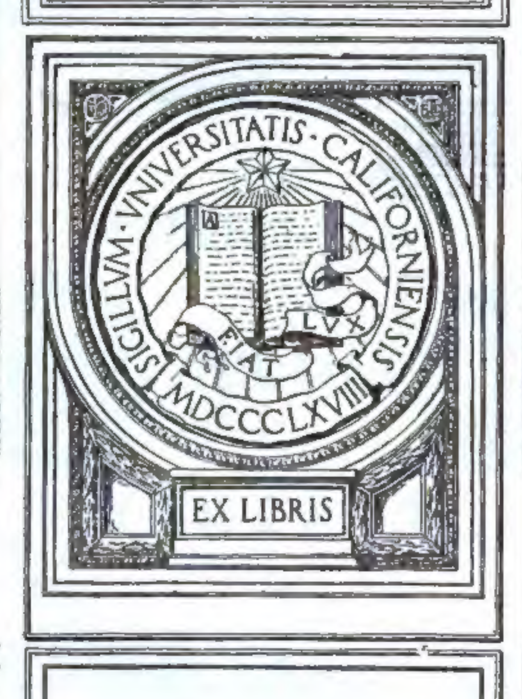






F … ND

IN THE

CITY OF NEW YORK

SCHOOL OF MEDICINE OF COLUMBIA UNIVERSITY

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEHNTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

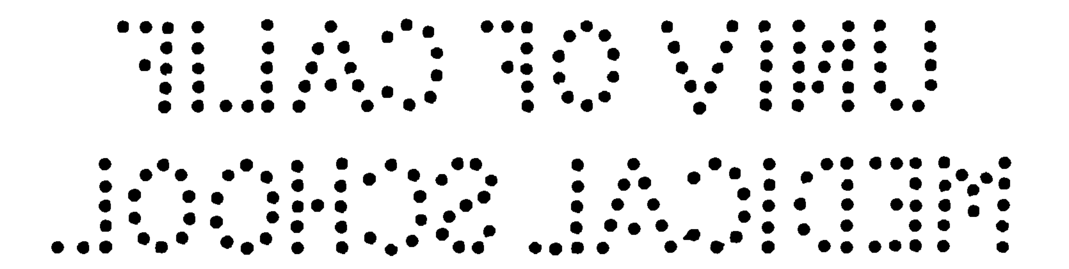
O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

ZEHNTER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1907



INHALT DES ZEHNTEN BANDES.

A. Abhandlungen.

B. Kürzere Mitteilungen.

I.

Untersuchungen über den Glykogenumsatz in der Kaninchenleber.

Zweite Mitteilung.

Von Prof. Dr. med. **Ivar Bang** und den Amanuensen **Malte Ljungdahl** und **Verner Bohm.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Lund.

In unserer ersten Mitteilung haben wir eine Methode zur Bestimmung der Leberdiastase mitgeteilt, nach welcher man die in einem gegebenen Zeitmoment existierende intravitale Fermentquantität bestimmen kann. Nach dieser Methode haben wir die Fermentproduktion bei verschiedenen physiologischen Versuchsbedingungen näher studiert. Unsere Ergebnisse wiesen darauf hin, daß die Fermentproduktion in der Leber eine indirekte, reflektorisch vom Nervensystem ausgelöste ist. Auf diese Erfahrungen uns stützend, sind wir zum näheren Studium der interessantesten sich darbietenden Frage, der Bedeutung des Nervensystems für die Sekretion des Leberenzyms, übergegangen.

Schon seit Cl. Bernard ist die eminente Bedeutung des Nervensystems für die Zuckerproduktion der Leber bekannt. Inwieweit aber diese Zuckerproduktion von dem spezifischen Leberferment hervorgerufen wird oder nicht, bleibt noch zu beantworten. Wie in unserer ersten Mitteilung erwähnt, ist die Voraussetzung einer solchen vermehrten Fermentproduktion keineswegs notwendig, und in der Tat neigen manche Autoren anderen Auffassungen zu.

Von nervösen Einwirkungen, welche eine vermehrte Zuckerproduktion veranlassen, sind sowohl periphere als zentrale bekannt, z. B. die Piqûre und die Vagusreizung. Ehe wir aber zu der Besprechung unserer Ergebnisse übergehen, seien zunächst einige

Versuche mitgeteilt, welche freilich ursprünglich in anderer Absicht ausgeführt worden sind.

4. Der Glykogenumsatz bei Kaninchen nach dem Nackenschlage.

Wie oben bemerkt, umfaßt unsere erste Versuchsserie Tiere, denen die Lebern in voller Verdauung exstirpiert wurden. Anstatt jedesmal zu narkotisieren, haben wir einige Tiere unmittelbar vor der Leberexstirpation durch einen Schlag mit dem Hammer auf den Hinterkopf getötet. Daß das eine wesentliche Verschiedenheit in der Versuchsanordnung bedeutet, darauf wurden wir erst aufmerksam, als die Versuchsergebnisse zusammengestellt wurden und sich ohne erkennbare Ursache bald ein geringerer, bald ein größerer Umsatz ergab. Erst eine systematische Untersuchung mit peinlicher Einhaltung der Versuchsbedingungen lehrte, daß der Nackenschlag an sich eine abweichende Wirkung auslöst. Daß diese Wirkung nervöser Art und nicht dem Tode des Tieres zuzuschreiben ist, geht aus der Tatsache hervor, daß bei einigen Tieren der Tod nicht eintrat, wenngleich sie durch den Schlag alle das Bewußtsein verloren hatten. Aus den Versuchsprotokollen teilen wir die Ergebnisse mit, indem wir hinzufügen, daß 4 von den 6 Versuchen planmäßig in dieser Richtung ausgeführt worden sind. Sämtliche Tiere hatten vorher Zucker bekommen.

Tabelle I[1]).

Versuchs-Nr.	Lebergewicht g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
39	76	8,6	11,3	2,58	**30,0**
40	83	5,1	6,1	1,02	**20,0**
41	88	8,6	9,8	2,32	**27,0**
42	110	5,5	5,0	1,38	**29,0**
43	120	11,7	9,1	0,94	**10,3**
44	200	25,3	12,6	12,90	**51,0**
Durchschnittlich . .		10,8	—	3,36	**27,9**

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß das Ergebnis dieser Versuche von jenem der ersten Serie (siehe unsere erste Mitteilung S. 417) sehr verschieden ist. Da aber gerade Versuch Nr. 43 einer der ersten war, so wird unser ursprünglicher Fehlschluß

[1]) Versuche von Ljungdahl, sämtliche später von Bang.

erklärlich. Mit dieser einen Ausnahme zeigen die Versuche einen sehr bedeutenden Glykogenumsatz.

Da der Nackenschlag gerade die Gegend des „Zuckerzentrums“ von Cl. Bernard trifft, so liegt nahe, anzunehmen, daß die Erregung dieses Zentrums die Fermentproduktion hervorgerufen hat. Daß der Versuch Nr. 43 keinen größeren Umsatz veranlaßt hat, ist kein Widerspruch. Ist ja doch bekannt, daß auch der Zuckerstich zuweilen wirkungslos bleibt. Auch muß man, wie wir ausdrücklich bemerkt haben, bei so vielen Fehlerquellen, wie sie hier gegeben sind, mit dem Vorkommen einiger Fehlversuche rechnen.

Diesen Erfolg des Nackenschlages darf man mit den Diabetesformen vergleichen, welche nach Erschütterung des Kopfes, besonders nach Kontusionen, eintreten. Hiermit ist bewiesen, daß die nach einer Erschütterung auftretende Glykosurie wenigstens in dem ersten Stadium auf einer Hypersekretion der Leberdiastase beruhen kann.

Diese Folgerung setzt allerdings voraus, daß die von uns beobachtete Fermentsekretion auch im Leben eine vermehrte Zuckerproduktion mit nachfolgender Hyperglykämie und Glykosurie bewirkt, wie dies auch auf Grund unserer früher gegebenen Deduktion zu erwarten ist. Doch geben wir gern zu, daß damit ein sicherer Beweis hierfür noch nicht erbracht ist. In dem folgenden Abschnitte soll dieses Postulat sicherer begründet werden.

Weiter ist zu bemerken, daß die Fermentsekretion so gut wie augenblicklich nach der Einwirkung des Reizes — also des Schlages — eintreten muß, denn die Exstirpation der Leber geschah höchstens zwei Minuten danach, und doch fand sich dann bereits die höchst bedeutende Zunahme der Enzymmenge, nach dem Glykogenumsatz geschätzt, das Vierfache der normalen Menge. In dieser Beziehung besteht ein Unterschied zwischen der Sekretion der Leberdiastase und jener der Verdauungsfermente, z. B. der psychischen Magensaftabsonderung, die erst einige Minuten nach der Einwirkung des Reizes beginnt. Dagegen stimmt diese Beobachtung vollständig mit unseren früheren Erfahrungen über die Fermentabsonderung nach Kältewirkung und Injektion hypisotonischer Kochsalzlösung überein. Wenn wir oben angedeutet haben, daß auch bei diesen das Nervensystem den Anstoß zur Sekretion gibt, so findet diese Annahme in den Beobachtungen über die Wirkung des Nackenschlages eine weitere Stütze.

Noch in einer anderen Beziehung haben unsere Beobachtungen über das Auftreten der bedeutenden Fermentmenge nach dem Nackenschlage, nach Verblutung usw. Interesse. Die früheren

Untersucher, wie z. B. Cl. Bernard, haben behufs Fermentuntersuchung die Leber aus den toten Tieren exstirpiert. Daß man in solchen Fällen öfter einen großen Umsatz beobachtet hat, läßt sich — von der Blutdiastase ganz abgesehen — wahrscheinlich aus der Todesart der Versuchstiere erklären. Auch lassen sich die höchst widerspruchsvollen Befunde über die saccharifizierende Wirkung der Leber — einige Beobachter haben großen, andere nur geringen Umsatz nachweisen können — wenigstens teilweise aus der verschiedenen Todesart erklären.

Man hat z. B. das eine Mal das Tier durch Verblutung, ein anderes Mal durch Nackenschlag, Durchschneidung der Oblongata usw. getötet. Vielleicht hat man auch die Exstirpation erst einige Zeit nach dem Tode vorgenommen, und es ist uns sehr plausibel, obwohl wir keine Versuche darüber besitzen, daß die Fermentproduktion post mortem, falls die nervöse Verbindung mit dem Gehirne nicht unterbrochen wird, einige Zeit weitergeht. Da meistens über diesen Punkt nichts mitgeteilt wird, ist es nicht möglich, hierauf näher einzugehen.

An dieser Stelle sei noch einmal die Frage nach der Blutdiastase berührt. Bei den Versuchen an gut ernährten Tieren hatte sich ergeben, daß kein Parallelismus zwischen der Quantität des Leberenzyms und der Blutdiastase besteht. Es war nicht ohne Interesse, zu untersuchen, wie sich die Sache bei größerem Gehalt an Leberferment verhält. Solche vergleichende Versuche haben wir bei den fermentreichen Lebern nach dem Nackenschlag ausgeführt.

Die Versuchstechnik war dieselbe wie bei den gut ernährten Tieren (10 ccm Blut und 15 ccm 0,8proz. NaCl-Lösung zu jeder Blutprobe, 25 ccm NaCl-Lösung wie gewöhnlich zu den übrigen).

Tabelle II.

Versuchs-Nr.	Umsatz ohne Blut Proz.	Umsatz von 10 ccm Blut Proz.
39	30	17
41	27	4
42	29	11
43	10,3	11
44	51	12

In den Blutproben ist der gefundene Umsatz abzüglich des gewöhnlichen Umsatzes gleich dem von der Blutdiastase bewirkten Umsatz.

Die Versuchsergebnisse stimmen mit den früheren überein. Auch hier ist kein Parallelismus zu finden, so z. B. ist im Versuch

Nr. 41 der Umsatz durch Leberferment groß und die Wirkung des Blutes gering, im Versuch Nr. 43 dagegen ist die Blutdiastase eher wirksamer. Auch die übrigen Versuche zeigen bestimmt, daß das Leberenzym nichts mit der Blutdiastase zu tun hat.

5. Der Glykogenumsatz in der Kaninchenleber nach dem Zuckerstich.

In den bis jetzt mitgeteilten Untersuchungen haben wir gefunden, daß bei reichlichem und mäßigem Glykogengehalt nur geringe Fermentproduktion besteht, was den tatsächlichen Verhältnissen im Leben entsprechen dürfte, da auch hier keine Überproduktion von Zucker gegeben ist. Andererseits ließ sich die vermehrte Fermentproduktion bei einem geringen oder minimalen Glykogengehalt als eine kompensatorische Einrichtung auffassen.

Wenn wir nun auch nach Verblutung, Nackenschlag, Kältewirkung usw. eine Überproduktion des Leberferments gefunden haben, so steht doch noch — strictissime dictu — der Beweis aus, daß diese vermehrte Fermentproduktion eine entsprechende intravitale Zuckerbildung nach sich zieht. Ein solcher Beweis läßt sich aber hier unmöglich liefern, da man die Tiere nicht so lange am Leben halten kann, bis die eventuell auftretende Überproduktion von Zucker im Harn oder Blut nachzuweisen ist.

Es wäre aber sehr wünschenswert, festzustellen, ob in der Tat eine solche Vermehrung der Fermentproduktion, die einem Umsatz von 12 bis 15 Proz. gegenüber der normalen von 6 bis 7 Proz. entspricht, auch intravital eine gesteigerte Produktion von Leberzucker mit Hyperglykämie und Glykosurie bewirkt, oder ob vielleicht der Organismus, bzw. die Leber, über Einrichtungen verfügt, welche der Vermehrung des Enzyms das Gleichgewicht halten. Die Beantwortung dieser Frage läßt sich vielleicht in anderer Weise erreichen.

Kann man nämlich zeigen, daß auch bei Einwirkungen, welche der gewöhnlichen Auffassung nach eine Hyperglykämie bzw. Glykosurie durch vermehrten Glykogenumsatz der Leber bewirken, eine vermehrte Fermentproduktion der Zuckerbildung vorangeht, so dürfte auch die Abhängigkeit jener Glykosurie von der gesteigerten Fermenttätigkeit als bewiesen gelten können.

Ein solcher Nachweis wäre um so erwünschter, als, wie schon eingangs der ersten Abhandlung bemerkt wurde, überhaupt noch nicht zwingend bewiesen ist, daß diese Glykosurien aus-

schließlich oder hauptsächlich von dem Umsatz des Leberglykogens abhängig sind.

Aber selbst wenn man dies zugesteht, ist damit noch lange nicht bewiesen, daß, z. B. nach der Piqûre, die Sekretion eines Körpers vorliegt, welcher den Glykogenumsatz bewirkt. Mindestens ebensogut läßt sich denken, daß die nach der Piqûre nachweislich auftretende Kongestion der Bauchorgane mit dem nachfolgenden reichlichen Auftreten von Blutdiastase als die prinzipielle Ursache der vermehrten Zuckerproduktion anzusehen ist. Von der Bestimmung der Fermentmenge der Leber nach unserer Methode ist wahrscheinlich hierüber Aufklärung zu erhalten.

Aber auch in anderer Beziehung dürfte das neue Verfahren vorteilhaft sein. Durch dasselbe wird man nämlich von dem zufälligen Vorhandensein von Leberglykogen vollständig unabhängig. Es ist z. B. bekannt, daß die Piqûre „unwirksam" bleibt, wenn die Kaninchenleber glykogenfrei ist. Nehmen wir aber einen Augenblick an, daß die Piqûre eine vermehrte Fermentproduktion bewirkt, so ist klar, daß diese ebensogut bei glykogenfreien Tieren vorkommen kann, trotzdem sie sich hier nicht als Glykosurie manifestiert. Es wäre sonach ganz falsch, aus dem Ausbleiben der Glykosurie schlechtweg die Folgerung zu ziehen, daß die Piqûre „unwirksam" geblieben ist. Dieses Beispiel genügt, um zu zeigen, wie rationell sich unsere Bestimmung der Fermentproduktion gestaltet gegenüber den früheren Untersuchungsmethoden.

Von solchen Überlegungen ausgehend, haben wir umfassende Untersuchungen über die Fermentproduktion der Leber bei den verschiedenen Glykosurien angestellt. Wir wollen zunächst über unsere Versuche, betreffend den Fermentgehalt der Leber nach dem Zuckerstich, berichten, welche sich übrigens nahe an die Versuche mit dem Nackenschlag anschließen.

Bei diesen Versuchen war es in jedem Falle notwendig zu kontrollieren, ob die Piqûre gelungen war. Durch den Nachweis von Zucker im Harn läßt sich dies sonst leicht bestimmen. Da aber bekanntlich nach dem Zuckerstich erst in der ersten bis zweiten Stunde Zucker im Harn auftritt, und da wir vorher gefunden haben, daß die Fermentproduktion gleich nach dem Reize eintritt, und weiter selbstverständlich nicht wissen können, wie lange das gebildete Ferment in der Leber unverändert bleibt, so war a priori nicht zu sagen, in welchem Zeitpunkte die Fermentvermehrung am besten nachweisbar sein würde.

In Übereinstimmung mit den Verhältnissen beim Nackenschlag durfte man auch hier mit Wahrscheinlichkeit den Eintritt der Vermehrung gleich nach der Piqûre erwarten, nur fehlt, wenn man die Leber unmittelbar nach der Piqûre exstirpiert, die Garantie, daß dieselbe auch gelungen ist. Diese Schwierigkeit läßt sich jedoch durch Serienuntersuchungen überwinden. Hat man eine genügend große Versuchsserie ausgeführt, so hat man hierbei sicher mindestens einige gelungene Versuche beobachtet. Trotzdem haben wir nicht versäumt, die Fermentproduktion in der nachfolgenden Zeit zu verfolgen, und besitzen infolgedessen verschiedene Versuchsserien über die Fermentproduktion vom ersten Augenblick bis zu $2^1/_2$ Stunden nach der Piqûre.

Die meisten Tiere bekamen 30 g Rohrzucker 16 Stunden vor der Operation (einige Versuche betreffen Hungertiere), einige 20 g Rohrzucker und nur wenige Traubenzucker — wenn nämlich eine alimentäre Glykosurie gleichgültig war. Übrigens wurde, wenn möglich, der Harn vor der Operation auf Zucker untersucht. Nur sehr selten haben wir nach Traubenzucker eine alimentäre Glykosurie beobachten können. Der Rohrzucker bewirkt dagegen nach unseren Erfahrungen keine Glykosurie.

Wir werden zuerst unsere Ergebnisse über die Fermentproduktion unmittelbar nach der Piqûre mitteilen.

Tabelle III.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
45	2020	128	6,2	5,1	1,24	20,0
46	3200	120	10,7	9,0	2,00	18,7
47	2200	125	16,3	13,0	2,44	15,0
48	1600	86	8,0	9,3	1,13	14,2
49	2000	104	6,7	6,4	0,83	12,2
50	3500	184	10,5	5,7	1,88	17,9
51	1500	183	20,5	11,2	0,84	4,1
52	900	112	13,5	12,5	1,54	11,4
	Durchschnittlich . .		11,6	—	1,50	14,4

Nach dem Zuckerstich wurden die Tiere narkotisiert und laparotomiert. Die Lebern waren spätestens 5 Minuten nach dem Stiche herausgenommen. Wir bemerken ausdrücklich, daß man die Tiere nicht vor der

Piqûre narkotisieren soll, sondern erst nachher. Es ist bekannt, daß die Piqûre an narkotisierten Tieren wirkungslos ist, was wir in einem darauf gerichteten Versuche auch für die Fermentproduktion bestätigen konnten. Die Versuche sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Ein Blick auf die Tabelle zeigt den Effekt des Zuckerstiches, doch werden wir mit der Diskussion der Resultate warten, bis die übrigen Versuchsserien mitgeteilt sind. Nur seien im Anschluß zwei Versuche angeführt, wo die Kaninchen durch Hunger glykogenfrei geworden waren.

Tabelle IV.

Versuchs-Nr.	Hungertage	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Zugesetztes Glykogen Proz.	Umsatz Proz.
53	5	700	63	9,5	20
54	2	2500	76	7,3	33

Zu den abgewogenen Proben (Nr. 53 20 g, Nr. 54 25 g) wurde die Glykogenlösung zugesetzt und wie gewöhnlich die Kontrollprobe gekocht. In Versuch Nr. 54 wurde die Leber erst $^3/_4$ Stunde, in Versuch 53 gleich nach der Piqûre exstirpiert.

Beide Versuche zeigen ganz überzeugend, daß der Effekt der Piqûre derselbe ist, gleichgültig, ob die Leber glykogenhaltig ist oder nicht. Es ist also keineswegs für das Gelingen der Piqûre notwendig, daß die Leber Glykogen enthält.

Die übrigen Versuche über Zuckerstich lassen sich in Serien einteilen, und zwar nach der Zeit, die von dem Stiche bis zur Beendigung der Leberexstirpation verfloß. Es ergeben sich so fünf Serien, die erste mit dem kürzesten Intervall von $^1/_2$ Stunde, die letzte mit dem längsten von 2 bis $2^1/_2$ Stunden.

In allen diesen Versuchen kommt als neues Moment die Harnuntersuchung hinzu. Der Zuckergehalt wurde vor und nach der Piqûre quantitativ bestimmt. Da man aber nicht überall garantieren kann, daß die Blase nicht etwas Residualharn enthielt, kann diesen absoluten Werten kein größerer Wert zugesprochen werden. Ich werde deswegen immer später den Harnzucker in folgender Weise angeben: 0 gleich kein Zucker, — gleich wenig, + gleich deutlich etwa 0,15 bis 0,20 Proz. Dextrose, ++ gleich recht viel, etwa 0,3 bis 0,5 Proz., und +++ bedeutet reichliches Vorkommen von Dextrose. Die Tiere bekamen 16 Stunden vor dem Versuche Rohrzucker.

Tabelle V.

Zeit Min.	Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.	Harn-zucker
30	55	2400	153	15,0	9,6	1,11	7,4	—
	56	1800	123	11,1	9,0	0,40	3,6	—
	57	2700	102	3,0	2,9	0,26	8,5	+
	58	1800	100	8,6	8,6	0,16	1,9	0
	59	2200[1])	109	5,0	4,6	0,15	3,0	+
	60	1900[1])	104	6,7	6,4	0,38	5,6	0
		Durchschnitt . .		8,2	—	0,61	5,0	—
45	61	?	120	6,2	5,0	0,20	3,2	0
	62	3000	124	14,0	11,3	1,30	9,3	+
	63	1700	146	14,0	9,6	1,41	10,1	0
	64	2200[1])	109	8,8	8,0	1,37	15,6	+
	65	2000[1])	120	9,9	9,1	0,89	9,0	—
		Durchschnitt . .		10,6	—	1,03	9,4	—
60	66	3700	154	14,6	9,5	2,83	19,4	++
	67	?	67	4,2	6,3	0,02	0,5	+
	68	1900	80	5,3	6,6	0,36	6,7	+
	69	2100[1])	104	5,5	5,3	0,96	17,4	—
	70	1800[1])	101	4,8	4,8	0,76	15,8	—
		Durchschnitt . .		6,5	—	0,99	12,0	—
70	71	?	66	5,5	8,3	0,06	1,1	+++
	72	?	140	7,8	5,6	1,40	17,9	+++
		Durchschnitt . .		6,7	—	0,73	9,5	—
120	73	2500	144	14,9	10,3	2,76	18,5	+++
	74	2700	120	12,0	10,0	1,78	14,8	+
	75	4000	310	27,3	8,8	5,02	18,4	+++
150	76	1900	102	9,4	9,3	1,40	14,9	+++
		Durchschnitt . .		15,9	—	2,74	16,7	—

Aus den angeführten 32 Versuchen ergibt sich, wie die Tabellen lehren, ein recht bedeutender Unterschied in der Fermentproduktion; bald kann man eine wesentliche Vermehrung beobachten, und bald ist eine so geringe Fermentquantität gefunden, daß der Wert sogar unter dem bei den „Normalkaninchen“ gefundenen Umsatz liegt.

[1]) Aderlaßkaninchen.

Es fragt sich nun, ob vielleicht die Methode versagt hat, ob an ein Zusammentreffen nicht kontrollierbarer Bedingungen zu denken ist, oder ob die Zahl der Versuche zu gering ist. Vor allem ist daran zu denken, daß die Piqûre ohne erkennbare bestimmte Ursache mißlingen kann.

Wir können dieses Bedenken nicht ohne weiteres von der Hand weisen. Vielmehr geben wir gern zu, daß unsere Versuche nicht ganz einwandfrei sind, und es ist auch sehr wohl möglich, daß die Versuchsstatistik nicht so groß ist, als es die sicher sehr schwierigen Verhältnisse wünschenswert erscheinen lassen. Trotzdem glaube ich, daß größere methodologische Täuschungen nicht vorliegen können.

Wenngleich z. B. in der Tabelle III Versuch Nr. 51 nur 4,1 Proz. Umsatz gefunden sind, so stimmen doch sämtliche übrigen 7 Versuche ganz überein. In den Versuchen Nr. 45 und Nr. 46 habe ich sogar die Bestimmungen doppelt mit zwei Kontroll- und zwei nicht gekochten Proben ausgeführt. Die Befunde waren völlig übereinstimmend. In den Versuchen Nr. 71 und Nr. 72 sind zwar die Differenzen des Umsatzes höchst bedeutend, aber eben deswegen kann man auch sagen, daß sie unmöglich sich aus methodologischen Fehlern erklären lassen, und trotzdem haben wir doch in dem reichlichen Vorkommen von Harnzucker die Garantie, daß die Piqûre jedenfalls nicht mißlungen ist. Dasselbe ist auch mit den meisten übrigen Versuchen der Fall. Es trifft nur für sehr wenige zu, daß die Piqûre mißlungen sein kann.

Wenn man weiter mir die Einwendung machen wollte, daß die Zahl der Untersuchungen unzureichend ist, so möchte ich hierzu nur bemerken, daß ich es für besser halte, daß solche weitere Untersuchungen von anderen ausgeführt werden. Ich habe alle Versuche mit der größten Sorgfalt ausgeführt und habe die Auffassung, daß ich durch fortgesetzte Untersuchungen nicht viel mehr erreichen kann — bei Tierversuchen kann man ja nur zu einer relativen Sicherheit gelangen — um so mehr, als 15 von den 32 Versuchen von November 1906 bis Januar 1907 als Kontrollversuche ausgeführt sind. Sie haben sämtlich meine früheren Beobachtungen bestätigt. Ich glaube auch, daß die für den ersten Anblick so launenhafte Differenz der Enzymquantität sich sehr wohl erklären läßt und daß man eben hierdurch einen Einblick in den Mechanismus der tierischen Zuckerproduktion gewinnt, wie man ihn früher nicht haben konnte.

Wenn wir zunächst die Ergebnisse der Tabelle III, die Fermentproduktion unmittelbar nach der Piqûre, berücksichtigen, können wir in Übereinstimmung mit den Resultaten des Nackenschlages sagen, daß die Zuckerproduktion beim Zuckerstich von einem Glykogenumsatz in der Leber herstammt und daß dieser Umsatz durch das spezifische Leberenzym verursacht wird.

In Übereinstimmung mit den Befunden beim Nackenschlage, bei Kältewirkung und Durchspülung mit hypisotonischer Kochsalzlösung tritt also auch beim Zuckerstich unmittelbar nach der Einwirkung des Reizes die Fermentproduktion ein und ist in wenigen Minuten maximal geworden.

Läßt man die Tiere etwas länger, eine halbe Stunde nach der Piqûre, leben, so findet man auffallend wenig Ferment. In der mitgeteilten Versuchsreihe liegt das Mittel sogar unter der Norm (5 Proz. gegen 6,7 Proz.), doch fällt diese Differenz noch in die Fehlergrenzen.

Der Einwand, daß bei den Tieren dieser Versuchsreihe die Piqûre mißlungen ist, hat sehr wenig für sich. Die Serie umfaßt nicht weniger als sechs Versuche, und es wäre ein ganz besonderes Mißgeschick, wenn sie sämtlich mißlungen wären. Weiter enthält der Harn bei zwei Tieren Zucker! Endlich wurde bei den Versuchen Nr. 59 und Nr. 60 der Blutzucker bestimmt und doppelt so hoch als normal gefunden. Auch der Einwand hat nicht viel für sich, daß das initiale Auftreten von Enzym zufällig ist, wie man aus Versuch Nr. 51 schließen könnte; dieser Versuch steht ganz vereinzelt und ist wohl am einfachsten als mißlungen anzusehen. (Später soll eine andere Möglichkeit angedeutet werden.)

Es bleibt also nichts anderes übrig als anzunehmen, daß das zuerst gebildete Enzym nach einiger Zeit wieder aus der Leber verschwindet[1]).

Ist man damit einverstanden, so läßt sich folgern:

1. Die primäre Sekretion von Enzym hört nach einiger Zeit auf, und
2. das bereits gebildete Enzym wird entweder in der Leber zerstört, paralysiert oder aus ihr weggeschafft.

In betreff der Enzymmenge der Leber nach $^3/_4$, 1, $1^1/_2$ und 2 Stunden zeigen die Versuche nicht dieselbe Regelmäßigkeit. Bald findet man weniger und bald mehr Ferment. Trotzdem geht unzweideutig aus ihnen hervor, daß die Fermentproduktion später wieder zum Vorschein kommt — bisweilen schon nach $^3/_4$ Stunden, öfters jedoch erst nach 2 Stunden. Die Abnahme der Fermentproduktion nach der ursprünglichen Steigerung läßt sich am einfachsten durch die Annahme erklären, daß eine **Hemmung** der Fermentproduktion in der Zwischenzeit eintritt, die dann wieder von einer Steigerung abgelöst wird und so fort.

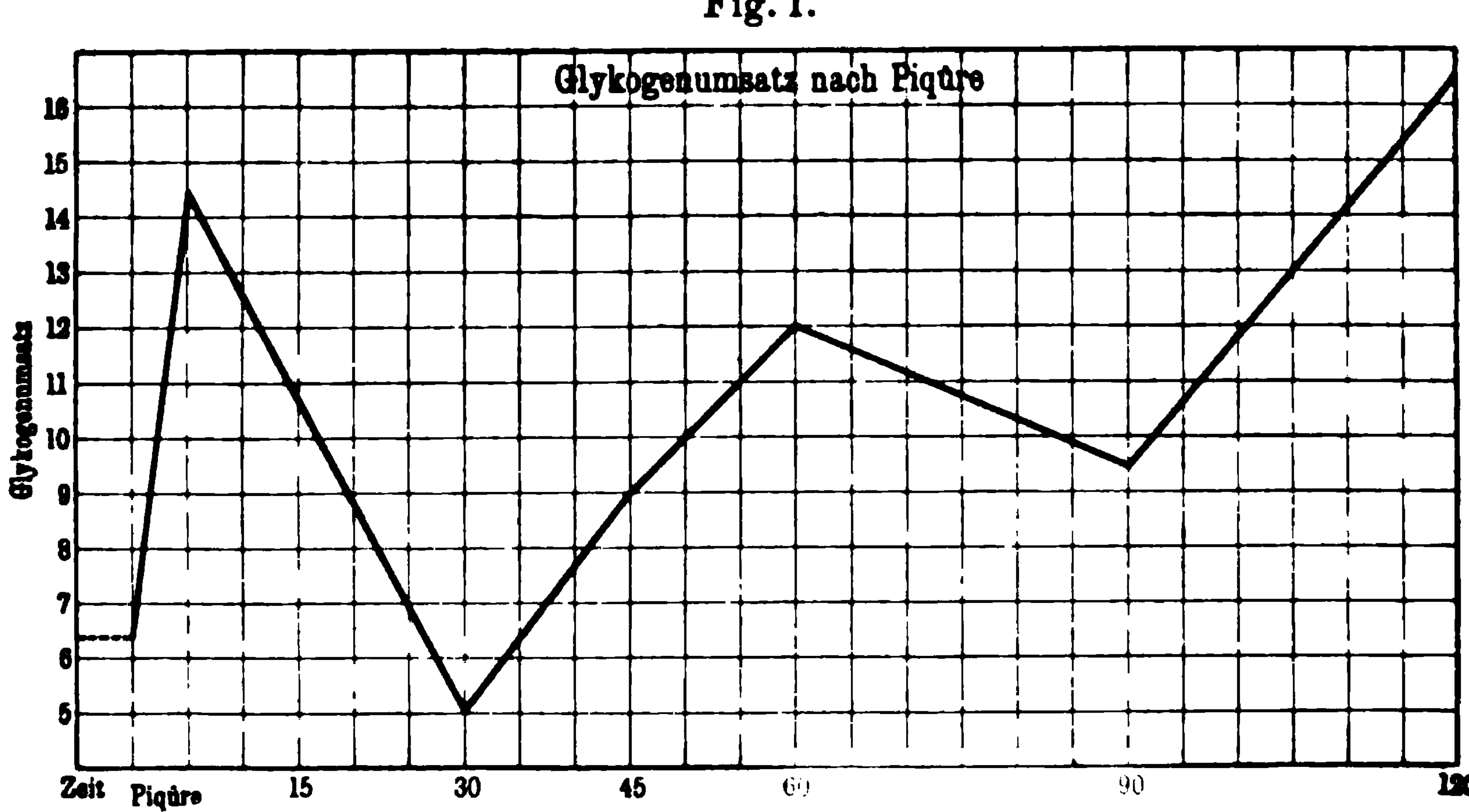
---

[1]) Es ist vielleicht nicht überflüssig, zu bemerken, daß der absolute Glykogenumsatz bei den zwei Serien vollkommen dem prozentischen entspricht. Die durchschnittliche Glykogenmenge ist 11,6 g und 8,2 g, mit einem Umsatz von 1,50 g und 0,61 g in 4 Stunden.

Wir hätten also bei dem Zuckerstich zwei Effekte zu berücksichtigen, Auslösung gesteigerter Fermentproduktion und Hemmung derselben. Wie diese Hemmung auf das einmal gebildete Leberferment einwirkt, lassen wir vorläufig unerörtert, wollen vielmehr unsere Aufmerksamkeit der Tatsache zuwenden, daß eine Aufhebung des initial gebildeten Enzyms stattfindet und daß kein oder nur sehr wenig neues Ferment neu gebildet wird.

Wir wollen zuerst das oben angedeutete Zeitgesetz genauer analysieren. Trotzdem, wie gesagt, die individuellen Unterschiede die Regelmäßigkeit stören, kann man doch dank den Serienuntersuchungen eine gewisse Gesetzmäßigkeit nachweisen, welche am besten bei graphischer Darstellung ersichtlich wird. (Die großen Unterschiede der einzelnen Versuche in der späteren Zeit nach der Piqûre sollen bald berücksichtigt werden.)

Fig. 1.



Aus der Fig. 1 läßt sich ganz unzweideutig das Alternieren zwischen Steigerung und Hemmung der Fermentwirkung ersehen.

Geht man von dieser Auffassung aus, so fragt sich zunächst, welcher Faktor die Fermenthemmung hervorruft. Man hat hier mehrere Möglichkeiten zu berücksichtigen.

Erstens läßt sich denken, daß das gereizte „Zuckerzentrum“ nach kurzer Zeit erschöpft wird. Das durch die zentrale Reizung einmal gebildete Leberenzym geht nach kurzer Zeit verloren — es wird mit dem Blute wegtransportiert oder von den Leberzellen selbst ohne zentrale Anregung zerstört. Nach und nach hat das Zuckerzentrum neue Energie aufgespeichert, die Erregung macht sich geltend, und es folgt eine neue Fermentproduktion.

Zweitens ist denkbar, daß das Zuckerzentrum zwar die ganze Zeit Impulse zur Fermentproduktion der Leber sendet, daß aber eine zeitweise Erschöpfung der Leberzellen eintritt.

Die dritte Möglichkeit, daß die Leberdiastase dank den Umsatzprodukten — dem gebildeten Zucker — nicht mehr funktioniert und nachher, wenn der Zucker aus der Leber ins Blut gekommen ist, aufs neue Zucker bilden kann, trifft nicht zu, da die herausgenommene Leber durchgespült wird und hinterher bekanntlich nur Spuren von Zucker enthält.

Auch die ersten zwei Möglichkeiten dürften nicht den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. Von Pawlows Untersuchungen über die Magensaftabsonderung bei Scheinfütterung wissen wir ja, daß die Sekretion stundenlang ohne Erschöpfung fortdauern kann. Wenn in diesem Falle sowohl der Zentralapparat — die Sekretion ist bekanntlich eine reflektorische — als auch die Drüsenzellen andauernd funktionsfähig sind, dürfte man per analogiam berechtigt sein, dasselbe für die Fermentsekretion der Leber anzunehmen.

Man hat deswegen in der ersten Reihe die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß diese Hemmung der physiologischen Regulation der Zuckerproduktion entspricht.

Wir können hierbei als Ausgangspunkt den Satz aufstellen, daß die physiologische Zuckerproduktion äußerst genau reguliert ist und reguliert sein muß. Es ist klar, daß die Ökonomie des Organismus fordert, daß nicht mehr Zucker aus den Depots (aus Glykogen) herangezogen wird, als das augenblickliche Bedürfnis fordert, sonst geht Zucker durch die Nieren verloren. Sodann ist ein vermehrter Zuckergehalt des Blutes keineswegs für die Lebensvorgänge der Zellen gleichgültig. Bekanntlich kann er auf verschiedene Weise toxisch wirken. Auf der anderen Seite unterliegt auch das Bedürfnis großen Schwankungen, z. B. bei Arbeit und Ruhe. Der Organismus muß dementsprechend imstande sein, sich einem vermehrten Bedürfnis augenblicklich anzupassen, aber auch ebenso schnell nachher den Glykogenumsatz zu vermindern.

Hieraus läßt sich mit Notwendigkeit folgern, daß die Regulation der Zuckerproduktion nicht ein statisches Gleichgewicht darstellen kann, sondern nur ein dynamisches. Mit Pfaundler können wir den Satz formulieren: Die Zuckerproduktion der Leber ist kein Gleichgewicht der Kräfte, sondern ein Gleichgewicht entgegengesetzter Vorgänge. Die Zuckerproduktion ist demgemäß als Resultante eines Produktions- und eines Hemmungsvorganges zu betrachten.

Die Vorzüge dieser Auffassung sind einleuchtend. Durch einen solchen Vorgang — und nur durch diesen — ist es dem Organismus möglich, die Zuckerproduktion in jedem Moment dem Bedarf schnell und genau anzupassen. Diese dynamische Regulierung herrscht überdies in der ganzen organischen Welt. Sowohl bei Pflanzen als Tieren kommt sie überall da vor, wo eine feine Einstellung der Regulierung notwendig ist. Beispiele hierfür anzuführen ist überflüssig. Es wäre höchst merkwürdig, wenn die Regulierung der Zuckerproduktion eine Ausnahme von dieser Regel bildete.

Ist man einmal mit dieser Auffassung einverstanden, so fragt es sich weiter, ob die Regulierung durch das Blut erfolgt (wie die respiratorische Regulation) oder nicht. Das Sinken der Blutzuckerkonzentration könnte z. B. das Produktionszentrum erregen, das Steigen umgekehrt das Hemmungszentrum. Auf die Verhältnisse bei Piqûre angewandt, soll das heißen, daß der Stich das Produktionszentrum reizt, folglich erscheint ein vermehrter Blutzuckergehalt, der Zucker erregt dann das Hemmungszentrum usw. Diese Auffassung — welche sich übrigens auf die Verhältnisse beim Hunger stützen kann, wo eine Verminderung des Blutzuckers mit entsprechend vermehrter Fermentproduktion tatsächlich vorliegt — kann man nichtsdestoweniger als unwahrscheinlich zurückweisen. Wir haben erstens schon in unserer ersten Abhandlung mitgeteilt, daß eine Durchspülung mit körperwarmer, zuckerhaltiger Kochsalzlösung keine Einwirkung auf die Fermentproduktion ausübt. Zweitens habe ich durch mehrere Bestimmungen des Blutzuckers nach Piqûre festgestellt, daß die Blutzuckermenge nur langsam und regelmäßig ansteigt, wie folgende Tabelle zeigt.

Tabelle VI.

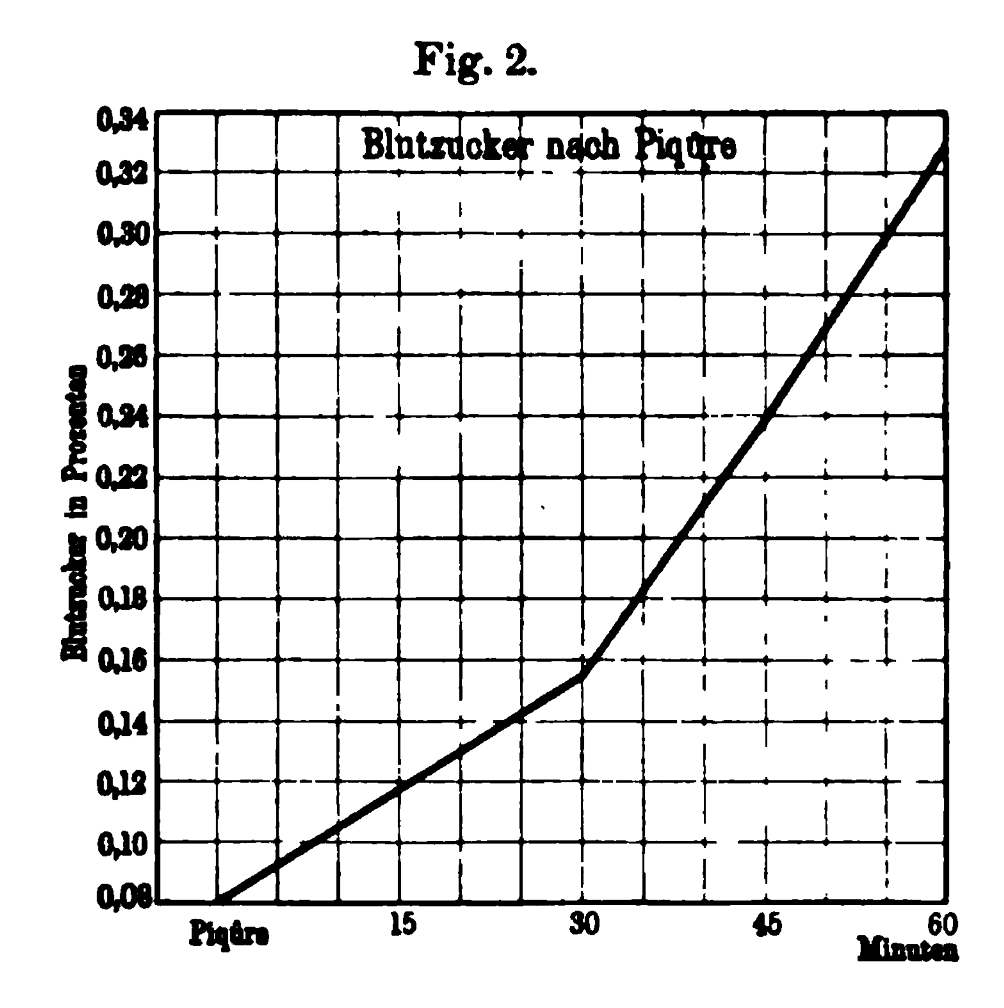
Zeitpunkt des Aderlasses nach der Piqûre Min.	Versuchs-Nr.	Blutzuckergehalt[1]) Proz.
30	59	0,16
30	60	0,15
45	64	0,26
45	65	0,22
60	69	0,29
60	70	0,38

[1]) Der Blutzucker wurde nach meiner Methode (Festschrift für Hammarsten und Biochem. Zeitschr. 1) bestimmt.

Zur besseren Übersicht habe ich die Ergebnisse in der Fig. 2 graphisch zusammengestellt.

Dem Zuckergehalte des Blutes nach dürfte man erwarten, daß die Hemmung viel später auftritt, als dies tatsächlich der Fall ist. Die Bestimmungen geben sonach keine Erklärung für das frühzeitige Auftreten der Hemmung. Die Hemmung ist sonach wahrscheinlich zentralen Ursprungs, speziell bei der Piqûre. Der Zuckerstich würde danach sowohl eine Reizung des Produktions- als auch des Hemmungszentrums bewirken. Anfangs würde die erstere überwiegen, dann würde das Produktionszentrum erschöpft und die Hemmung käme zur Geltung. Dann würde die Energie des Produktionszentrums wiederhergestellt, das Hemmungszentrum dagegen erschöpft usw. Danach ließe sich unsere Auffassung über das Wesen der Piqûre in folgender Weise formulieren: Die Vorgänge bei der Piqûre sind qualitativ dieselben wie in der Norm, nur sind die Ausschläge der entgegengesetzten, regulatorischen Kräfte quantitativ vergrößert.

Fig. 2.



Durch die zentrale Reizung wird das physiologisch nur einen schwachen Ausschlag zwischen Produktion und Hemmung gebende Pendel in stärkeren Gang versetzt, die Ausschläge werden nach beiden Seiten größer. Dann werden die Ausschläge wieder kleiner und sind nach einiger Zeit auf die normalen Schwingungen zurückgeführt: der Diabetes ist vorüber, was bekanntlich beim Zuckerstich auch der Fall ist. (Das letztere Moment ist zwar an den Versuchen nicht ersichtlich. Hierzu sind erstens die Versuche zu wenig zahlreich, und zweitens wurde der Umsatz in der späteren Zeit nach der Piqûre nicht weiter verfolgt.)

Die eben entwickelte Auffassung kann uns weiter die Erklärung der individuellen Unterschiede bei den verschiedenen Versuchen geben. Es ist eine bekannte Sache, daß die Zuckerausscheidung bei der Piqûre verschieden lange dauert. In der Regel dauert sie mehrere Stunden, oft nur 2 bis 3 Stunden und bisweilen nur 1 Stunde. Dies läßt sich daraus erklären, daß entweder das Pendel einmal früher, einmal später wieder zur Ruhe kommt,

oder auch daß das eine oder andere Zentrum bald mehr, bald weniger stark bzw. schnell gereizt wird, je nachdem der Stich getroffen hat. Dementsprechend steht a priori nichts der Annahme entgegen, daß die Hemmung bisweilen den ersten Effekt darstellt und daß z. B. der Versuch Nr. 51 gerade ein Beispiel hierfür ist. Da sich in dieser Beziehung viele Kombinationen denken lassen, kann man sehr wohl ein früheres oder späteres Auftreten der Hemmung bzw. Produktion verstehen. Denn es ist doch undenkbar, daß man immer genau dieselbe Stelle des vierten Ventrikels treffen kann. Eine kleine Verschiebung könnte sehr wohl die Unterschiede erklären. In der Tat glaube ich sogar, daß ich dafür bei absichtlicher Variation der Plazierung des Trepans eine gewisse Bestätigung bekommen habe. Ohne besonderes Gewicht darauf zu legen, darf ich wohl als meinen Eindruck anführen, daß die Hemmungswirkung ausgesprochener auszufallen schien, wenn der Trepan über der klassischen Stelle getroffen hatte.

Erstlich möchten wir hervorheben, daß die Befunde beim Zuckerstich eine Bestätigung unserer früheren Beobachtungen darstellen. Wenn wir beim Nackenschlag eine vermehrte Fermentproduktion nachgewiesen und dieselbe mit dem bei Erschütterung des Kopfes auftretenden Diabetes in Verbindung gesetzt haben, trotzdem selbstverständlich die Glykosurie hier nicht zur Erscheinung kommen konnte, geben die Versuche mit Piqûre uns das fehlende Glied der Folgerung.

Wir sehen auf der anderen Seite, daß beim Nackenschlag und Zuckerstich ganz dieselben Verhältnisse vorliegen, d. h. daß in beiden Fällen das Produktionszentrum erregt wird. Man braucht demgemäß das „Zuckerzentrum“ nicht mit dem Trepan direkt zu berühren, es genügt, wie beim Nackenschlag, dasselbe par distance zu erregen. In Übereinstimmung hiermit habe ich auch bei der Sektion gefunden, daß der Zuckerstich oft nicht die klassische Stelle des vierten Ventrikels getroffen hatte und trotzdem Glykosurie aufgetreten war. In zwei Fällen habe ich absichtlich mit dem Trepan nur den Schädel perforiert und das Kleingehirn durch Drehungen des Instrumentes erregt. Hier war somit die Basis cranii lange nicht getroffen, und doch bekamen die Tiere in beiden Fällen Glykosurie.

Solche Versuche haben bei uns den Zweifel erweckt, ob in der Tat Cl. Bernards Zuckerzentrum an der bekannten Stelle zu suchen ist. A priori ist es auch nicht gut verständlich, daß man eine Zuckerproduktion bekommt, wenn man das Zuckerzentrum zerstört, wohl aber wenn man dasselbe erregt. Bei Cl. Bernards Piqûre wird aber das Zentrum bei den Umdrehungen des Instrumentes zerstört. Man könnte eher annehmen, daß man hierdurch ein Hemmungszentrum ausgeschaltet hätte. Unsere Versuche haben

aber dargetan, daß das Hemmungszentrum hierbei wahrscheinlich nicht zerstört wird, und weiter, daß das Produktionszentrum auch bei Einwirkungen auf verschiedene Punkte des Ventrikels, des Kleinhirns und des Schädels, erregt werden kann.

Man darf deswegen eher annehmen, daß man beim Stiche keine Zentra zerstört, sondern daß man nur die Leitungsbahnen — direkt oder indirekt — erregt. Sonst wäre auch nicht gut verständlich, wie man durch die Piqûre sowohl eine Produktions- als eine Hemmungswirkung veranlassen kann.

In dieser Beziehung befinden wir uns in erfreulicher Übereinstimmung mit einem der besten Forscher über Piqûre, nämlich Eckhard, welcher nach umfassenden Untersuchungen zu folgender Auffassung gekommen ist: „Wenn man alle im vorigen mitgeteilten Erfahrungen zusammenfaßt, so bildet sich damit unwillkürlich die Vorstellung aus, daß die einzelnen Ganglienhäufchen vom letzten Halsganglion an diejenigen Organe sind, welche die Piqûre im vierten Ventrikel zu einem wahren Diabetesstich machen. Dabei muß ich bemerken, daß ich unterstelle, man treffe nur Fasern bei der Piqûre“ [1]).

Im vorigen habe ich von einer Hemmung der Fermentwirkung gesprochen und bin zu der Auffassung gekommen, daß diese zentraler Natur sein muß. Es fragt sich dann, wie sich diese Wirkung in der Leber äußert. Als die wahrscheinlichste Erklärung hat man in Übereinstimmung mit der modernen Auffassung an eine Antifermentwirkung zu denken, welche sich vielleicht als ein sekretorischer Vorgang auffassen ließe. Das Problem, auf welches ich hier nicht näher eingehen will, ist einer experimentellen Untersuchung zugänglich, welche ich auszuführen beabsichtige.

Eine interessante Analogie zu den hier mitgeteilten Verhältnissen bieten die pflanzenbiologischen Untersuchungen von Johannsen [2]) dar. Bei Ätherisierung von verschiedenen Pflanzen fand Johannsen, daß bei mittelstarken Ätherdosen die Quantität des Amidstickstoffs während der Narkose zunimmt und nach derselben abnimmt. Bei größeren Dosen kam eine Vermehrung sowohl während als nach der Narkose zur Beobachtung, und bei sehr großen, tödlichen Dosen fand er besonders nach der Narkose eine geringere Vermehrung.

[1]) Eckhard, Eckhards Beiträge 4, 30.
[2]) Studier over planternes periodiske livsytringer. Memoires de l'Académie des Sciences et des Lettres de Danemark, 6me série, t. VIII.

Durch ein und dasselbe Reizmittel hat also Johannsen die gerade entgegengesetzte Wirkung des proteolytischen Ferments gefunden, und es ist interessant, zu bemerken, daß die von Johannsen gegebene Erklärung völlig mit meiner Auffassung über die Piqûre zusammenfällt, trotzdem ich erst später (nach einem Vortrage) auf Johannsens Arbeit aufmerksam wurde.

6. Der Glykogenumsatz in der Kaninchenleber nach Nervenreizungen.

Wie Cl. Bernard und Eckhard nachgewiesen haben, geht der Impuls des zentralen Nervensystems zu der Leber durch Rückenmark und Sympathicus, während der Vagus die zentripetale Leitungsbahn darstellt. Durchschneidung der Vagi verhindert die Zuckerproduktion nicht, Erregung des Vagus bewirkt aber Zuckerproduktion nicht durch direkte Einwirkung auf die Leber, sondern durch Erregung des Zuckerzentrums. Dies läßt sich daraus entnehmen, daß die elektrische Reizung des peripheren Vagusstumpfes nach Vagusdurchschneidung ohne Wirkung bleibt, während die Reizung des zentralen Stumpfes eine Zuckerproduktion hervorruft. Von Eckhard ist ferner gezeigt worden, daß die Durchschneidung des Vagus allein eine vorübergehende Glykosurie bewirkt. Die Durchschneidung wirkt wie die elektrische Reizung.

Wir haben diese Verhältnisse in unsere Untersuchungen einbezogen. Unsere Versuche sondern sich in drei Gruppen:

Erstens haben wir die Fermentproduktion nach Durchschneidung der Vagi untersucht. Zweitens haben wir damit die Befunde bei elektrischer Reizung des zentralen Vagus-

Tabelle VII.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
77	2000	110	10,6	9,6	1,59	**15,0**
78	2000	116	23,8	20,5	4,76	**20,0**
79	?	108	6,5	6,0	0,72	**11,0**
80	?	190	9,6	5,1	2,40	**25,0**
81	2600	105	10,3	9,7	2,40	**23,3**
82	2000	110	10.5	9,5	1,58	**15,0**
		Mittel . .	11,9	—	2,24	**18,2**

stumpfes verglichen und endlich die Wirkung der elektrischen Reizung des peripheren Vagusstumpfes festgestellt. In der Tabelle VII teilen wir die Befunde nach doppelseitiger Vagusdurchschneidung mit. Die Leberexstirpation erfolgte eine Stunde nach der Durchschneidung. Sämtliche Tiere hatten vorher wie gewöhnlich Zucker bekommen.

Wenn auf der einen Seite Eckhard u. a. gefunden haben, daß die Durchschneidung des Vagus eine Zuckerausscheidung durch den Harn bewirkt, so ergeben andererseits die eben mitgeteilten Versuche einen entsprechend erhöhten Fermentgehalt der Leber. Man könnte annehmen, daß hiermit der Ursprung des Harnzuckers erklärt ist.

Trotzdem haben wir nicht versäumt, auch bei den Durchschneidungsversuchen eine systematische Untersuchung der Fermentproduktion gleich nach der Durchschneidung und verschiedene Zeit nach derselben auszuführen, wozu die beim Zuckerstich gefundenen Verhältnisse Anlaß gaben. Eine solche Untersuchung war um so mehr geboten, als der Ausscheidung des Zuckers, die schon nach einer Stunde eintritt, notwendig eine entsprechende Periode der Bildung vorangehen muß.

Wir lassen die Befunde folgen.

Tabelle VIII.

Zeit der Operation nach der Durchschneidung Min.	Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Umsatz Proz.
5	83	2100	100	9,5	9,5	7,8
15	84	2000	120	20,0	16,7	5,0
30	85	2400	102	5,5	5,4	5,4
45	86	2100	81	4,5	5,5	4,1
			Durchschnitt . .	9,9	—	5,6

Aus den Versuchen geht hervor, daß weder unmittelbar nach der Durchschneidung noch in den folgenden $^3/_4$ Stunden eine vermehrte Fermentproduktion vorkommt — wenn überhaupt eine Folgerung aus den wenigen Versuchen erlaubt ist —, während man nach einer Stunde eine solche konstant nachweisen kann.

Eine Erklärung hierfür ist nicht leicht zu geben. In erster Linie hat man daran zu denken, ob nicht etwa die doppelseitige Vagusdurchschneidung die Fermentproduktion als sekundären

Vorgang auslöst. Es ist ja bekannt, daß die Tiere einige Zeit nach einer solchen doppelten Durchschneidung an Asphyxie sterben. Man konnte sich demgemäß vorstellen, daß die Erstickung die notwendige Nervenreizung bewirkt, und da sich diese nur allmählich ausbildet, könnte man sich vielleicht hieraus die späte Steigerung der Enzymproduktion erklären. Da aber die Tiere einseitige Vagusdurchschneidung überleben und da auch in diesem Falle bisweilen Glykosurie vorkommt, läßt sich dies ausschließen.

Tabelle IX berichtet über Tiere, welche eine Stunde nach der Durchschneidung des rechten Vagus zur Untersuchung kamen.

Tabelle IX.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Umsatz Proz.
87	4500	119	6,9	5,7	**16,0**
88	2500	110	6,4	5,8	**13,1**

Wie man sieht, kommt auch nach der einseitigen Vagusdurchschneidung mit der Zeit eine vermehrte Fermentproduktion zustande. Wir haben also keinen Grund anzunehmen, daß irgend welche sekundäre Reaktionen die Fermentproduktion bewirken. Es macht daher, wenn es gestattet ist, eine Vermutung auszusprechen, den Eindruck, daß die Vagusdurchschneidung in irgend einer Weise zuerst ein die Zuckerproduktion beherrschendes Hemmungszentrum und nachher das Zentrum für die Zuckerproduktion erregt. Denkbar wäre auch, daß das Hemmungszentrum stärker gereizt wird, während die geringe Erregung des Zuckerzentrums erst nach der Erschöpfung der Hemmung zum Vorschein kommt.

Eine andere Möglichkeit ist die, daß der Reiz der Durchschneidung nur das Zuckerzentrum trifft, daß aber dieser Reiz nur eine kleine Intensität besitzt und demgemäß erst nach Summation des Reizes einen Ausschlag bewirken kann.

Welche Auffassung die richtige ist, entzieht sich vorläufig unserer Erkenntnis. So viel ist sicher, daß das Verhalten nach Vagusdurchschneidung nicht mit jenem nach Piqûre, Nackenschlag, Kältewirkung, Verblutung und Durchspülung mit hypisotonischer Kochsalzlösung übereinstimmt, da bei allen diesen die Fermentproduktion augenblicklich nach der Einwirkung des Reizes einsetzt.

Und dieser Unterschied erscheint noch rätselhafter, wenn man das Auftreten der Glykosurie ins Auge faßt. Die Durchschneidung des Vagus bringt zwar nicht konstant eine Zuckerausscheidung im Harn hervor; wenn dies aber der Fall ist — und in den Versuchen Nr. 85 und Nr. 86 wurden 0,04 g bzw. 0,35 g Zucker ausgeschieden — kann man ihr Eintreten schon in der ersten Stunde, also zur selben Zeit wie z. B. nach der Piqûre beobachten.

Der Zucker aber, welcher schon in der ersten Stunde ausgeschieden wird, muß selbstverständlich einige Zeit vorher gebildet worden, und es muß eine Hyperglykämie seiner Ausscheidung vorausgegangen sein — vorausgesetzt, daß nicht ein Nierendiabetes vorliegt. In Analogie mit dem Auftreten von Zucker im Harn bei der Piqûre dürfte diese Zuckerproduktion etwa $^1/_2$ bis 1 Stunde vorher beginnen, d. h. sehr kurze Zeit nach der Durchschneidung des Vagus, zu welcher Zeit wir aber keine vermehrte Fermentproduktion in der Leber gefunden haben.

Bei der Durchschneidung des Vagus haben wir es somit mit sehr komplizierten Verhältnissen zu tun, indem es zuerst zur Zuckerproduktion kommt und dann erst zur Vermehrung der Fermentproduktion in der Leber.

Wir haben zur Aufklärung dieses Verhaltens eine Entscheidung darüber angestrebt, ob es sich um einen Nierendiabetes oder eine hyperglykämische Glykosurie handelt. Wir sind dabei von folgender Überlegung ausgegangen:

Wenn die Vagusdurchschneidung eine Glykosurie bewirkt, muß der auftretende Reiz reflektorisch die Zuckerbildung bzw. Zuckerausscheidung auslösen. Da aber der Reiz der Durchschneidung nicht konstant zu Zuckerausscheidung führt, scheint es vorteilhafter, mit einem genau dosierten Reizmittel zu arbeiten. Es ist mit anderen Worten bequemer und zuverlässiger, die elektrische Reizung des zentralen Nervenstumpfes zu benutzen, welche ziemlich konstant — besonders bei Einhaltung von Eckhards Vorschriften — zu Glykosurie führt.

In der folgenden Tabelle (X) sind die Ergebnise hierüber zusammengestellt. Der Harnzucker ist wie bei den Piqûreversuchen angeführt.

Zur besseren Übersicht habe ich die Versuchsergebnisse in Fig. 3 graphisch dargestellt, wo zum Vergleich der Glykogenumsatz nach der Piqûre angeführt ist.

Tabelle X.

Zeit nach Vagusdurchschneidung Min.	Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.	Harnzucker
6–7	89	2100	134	5,0	3,7	0,40	7,8	0
	90	1200	119	9,2	7,8	0,92	10,0	0
	91	2400	159	15,3	9,6	—	0,0	0
	92	1800	181	22,4	12,4	1,63	7,3	0
	93	2100	202	25,2	12,5	1,81	7,2	0
10	94	2000	102	8,1	8,0	0,49	6,1	0
Durchschnittlich . .				14,2	—	0,88	6,4	—
30	95	2000	150	15,0	10,0	0,60	4,0	+
	96	1900	117	9,9	8,5	0,51	5,2	—?
	97	1500	120	14,1	11,7	0,52	3,7	—?
	98	1700[1]	106	4,5	4,3	0,37	8,3	0
	99	?	125	4,1	3,3	—	0,0	nicht untersucht
	100	?	106	2,4	2,3	0,06	2,3	nicht untersucht
	101	2700	127	12,2	9,5	0,40	3,3	—
	102	2800	130	12,7	9,8	1,12	8,8	—
Durchschnittlich . .				9,2	—	0,45	4,7	—
40	103	1500[1]	108	11,3	10,5	1,19	10,5	+++
	104	3200	117	6,8	5,8	0,45	6,7	++
Durchschnittlich . .				9,1	—	0,82	8,6	—
50	105	1400[1]	127	12,7	10,0	1,92	15,1	+++
	106	?	225	20,7	9,2	0,60	3,0	kein Harn
	107	?	86	8,6	10,0	0,76	8,8	kein Harn
Durchschnittlich . .				14,0	—	1,09	9,0	—
60	108	3600	192	21,1	11,0	2,49	11,8	+++
	109	3000[1]	189	9,4	5,0	0,75	8,0	—
	110	2100[1]	104	7,8	7,5	1,13	14,5	+
	111	2000	105	7,7	7,4	1,19	15,5	+++
	112	2000	147	18,5	12,6	2,22	12,0	+++
	113	1800	95	8,6	9,0	0,70	8,2	+++
	114	3600	192	21,1	11,0	2,49	11,8	+++
	115	1100[1]	127	12,7	10,0	1,92	15,1	+++
Durchschnittlich . .				13,4	—	1,61	11,8	—

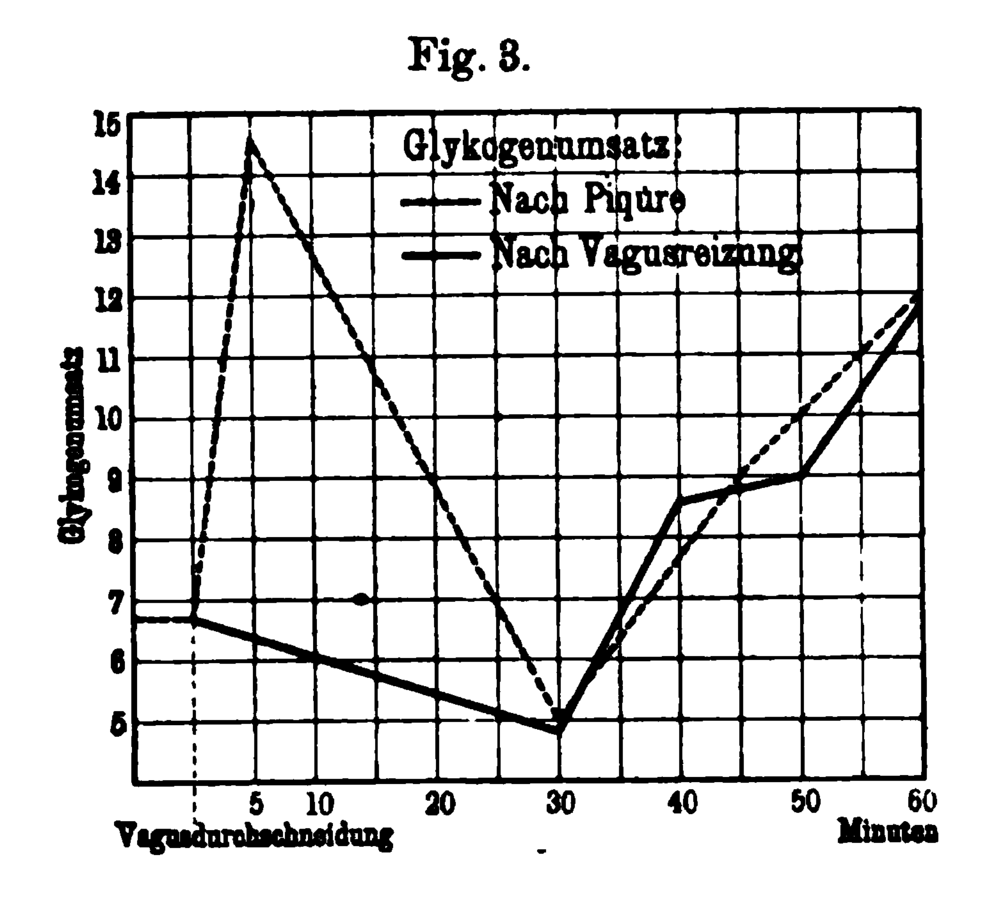
[1]) Aderlaßkaninchen.

Der Unterschied ist ein schlagender, besonders betreffs des Umsatzes in der ersten Zeit. Später, d. h. nach der ersten halben Stunde korrespondieren die Kurven dagegen beinahe vollständig.

Es fragt sich nun: Ist dieser Unterschied ein gesetzmäßiges Vorkommnis oder geben uns die Versuche ein falsches Bild? Wir übersehen nicht die Schwierigkeiten und Fehlerquellen, welche hier wie überall unseren Versuchen anhaften, und möchten deswegen auch jetzt unsere Schlußfolgerungen nur mit der hier gebotenen Reserve geben und überhaupt hervorheben, daß unsere Untersuchungen hauptsächlich zur Orientierung für künftige Fragestellung dienen sollen und die endgültige Aufklärung der Zukunft vorbehalten bleiben muß.

Wir kommen auf die Diskussion der Versuchstabellen zurück. Wir haben nach Vagusreizung anfangs keine vermehrte Fermentproduktion gefunden, wie die Durchschnittswerte anzeigen. Freilich beträgt der Umsatz des Versuchs Nr. 90 10 Proz., auf der anderen Seite zeigt in Tabelle III Versuch Nr. 51 nur 4,1 Proz. Umsatz. Da aber sämtliche übrigen Versuche — bei Vagusreizung 5 und bei Piqûre 7 — ganz bestimmt für die nämliche Auffassung sprechen und da ferner beide Versuchsserien Tiere mit ungefähr demselben Glykogengehalt der Leber umfassen (weshalb auch der absolute Umsatz, für Gesamtglykogen berechnet, 0,88 g und 1,50 g entspricht), so nehmen wir, in Übereinstimmung mit unserem Grundsatz, nur die Serien und nicht die Einzelversuche zu beurteilen, vorläufig an, daß die nach Piqûre und Vagusreizung auftretende Glykosurie nicht denselben Ursprung hat und daß wir es dementsprechend hier mit zwei verschiedenen Diabetesformen zu tun haben[1]). Die ursprünglich von Cl. Bernard formulierte Auffassung, daß die elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes denselben Effekt wie die Piqûre bewirkt: Reizung des Zuckerzentrums, wäre infolgedessen nicht richtig. Die von Eckhard und uns angedeutete Möglichkeit, daß

Fig. 3.



[1]) Von der nachher auftretenden Fermentproduktion wird später die Rede sein.

der vierte Ventrikel nicht das Zentrum oder die Zentra, sondern nur Leitungsbahnen, Fasern, enthält, kann vielleicht unsere Auffassung über die Vagusreizung stützen.

Da diese Tatsache einer prinzipiellen Bedeutung nicht entbehrt, haben wir sie durch andere Untersuchungen sicherzustellen versucht.

Ehe wir hierüber berichten, möchte ich zuerst einige Bemerkungen über die Versuche selbst machen. Die Versuche Nr. 89 bis 94 sind derartig ausgeführt, daß unmittelbar nach der Vagusdurchschneidung der zentrale Nervenstumpf 3 Minuten kräftig gereizt wurde. Dann folgte augenblicklich die Narkose, welche durchschnittlich 4 Minuten in Anspruch nahm. Versuch Nr. 94 gehört auch hierher, trotzdem es hier etwa 5 Minuten länger bis zur Leberexstirpation dauerte. Die meisten Tiere bekamen vorher 30 g Rohrzucker. Nur in den Versuchen Nr. 99, 100, 106 und 107 wurde kein Zucker gegeben. In Versuch Nr. 107 wurde der Leberbrei mit Glykogenlösung versetzt. Der Glykogengehalt der Leber war 1,50 Proz. Bei der Reizung wurde gewöhnlich nach Eckhard vorgegangen (mehrmalige Reizung von 4 Minuten Dauer mit 10 Minuten Pause zwischen den Reizungen). Übrigens wurde bisweilen etwas kürzere oder längere Zeit gereizt, im ersten Falle mit einer entsprechend kürzeren Pause. Im ganzen kann ich das Verfahren Eckhards empfehlen. Bei einigen Tieren wurden 30 bis 40 ccm Blut entnommen. Wie bei der Piqûre scheint ein so geringer Aderlaß keine Bedeutung zu haben.

Von den Bedenken, welche gegen die Beweiskraft der Versuche angeführt werden können, habe ich noch zwei nicht erwähnt. Erstens könnte man die Möglichkeit betonen, daß die Versuche, welche keinen Umsatz ergeben haben, mißlungen sein könnten, und zweitens könnte man denken, daß die später auftretende Fermentproduktion die Glykosurie bewirkt. Beide Einwände sind nicht stichhaltig. Die Zuckerbildung kommt beinahe immer nach der Reizung vor, obwohl die Zeit des Auftretens variieren kann. Und daß die letztere Eventualität nicht zutrifft, geht sehr schön aus dem Versuche Nr. 104 hervor. Hier wurden 28 ccm Harn mit 0,28 Proz. Zucker ausgeschieden, und der Umsatz wurde zu 6,7 Proz. gefunden. Dieser Versuch zeigt auch ganz unzweideutig, daß der gesamte Umsatz — in 4 Stunden 0,48 g — unmöglich die Ausscheidung des Harnzuckers — im ganzen 0,08 g — erklären kann, wenn dieser eine Hyperglykämie vorangeht. Nun könnte man vielleicht behaupten, daß hier 40 Minuten nach der Vagusdurchschneidung eine Fermentproduktion vorangegangen ist — wenn nicht bald nachher oder nach 30 Minuten, so doch z. B. 15 Minuten oder 20 Minuten nachher. Eine solche Behauptung ist jedoch wenig überzeugend. Es ist kaum denkbar, daß

die Fermentproduktion genau immer in diesem Zeitmoment eintreten und daß man ihr in den acht Versuchen Nr. 95 bis 102 nicht begegnet sein sollte.

Wir kommen deswegen zu der Frage: Bewirkt die Vagusreizung eine Hyperglykämie oder nicht? Fehlt die Hyperglykämie — und meines Wissens hat dies bis jetzt niemand untersucht —, so spricht dies für Nierendiabetes, ist sie vorhanden, so kommt ein Nierendiabetes wenigstens als hauptsächliche Quelle der Glykosurie nicht in Betracht, obwohl auch in diesem Falle eine Mitwirkung der Nieren durch Erhöhung ihrer Durchlässigkeit nicht ausgeschlossen wäre.

Es ist auch klar, daß der Nachweis eines Nierendiabetes mit unserem Befunde gut übereinstimmen würde und zugleich eine Bestätigung desselben darstellen könnte. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle XI[1]).

Versuchs-Nr.	Zeit nach Vagusdurchschneidung Min.	Blutmenge entnommen g	Blutzucker Proz.
98	30	37,8	0,14
116	30	27,8	0,14
103	40	30,1	0,18
115	50	35,1	0,19
117	60	64,4	0,21
118	70	27,5	0,23

Wie bei der Piqûre stelle ich die Ergebnisse zur besseren Übersicht graphisch in Fig. 4 zusammen. Zum Vergleich ist der Blutzuckergehalt nach dem Zuckerstich beigefügt.

Wie man sieht, kommt zweifelsohne ein vermehrter Zuckergehalt nach der Vagusreizung wie nach der Piqûre vor, und der Unterschied ist nur von quantitativer Art.

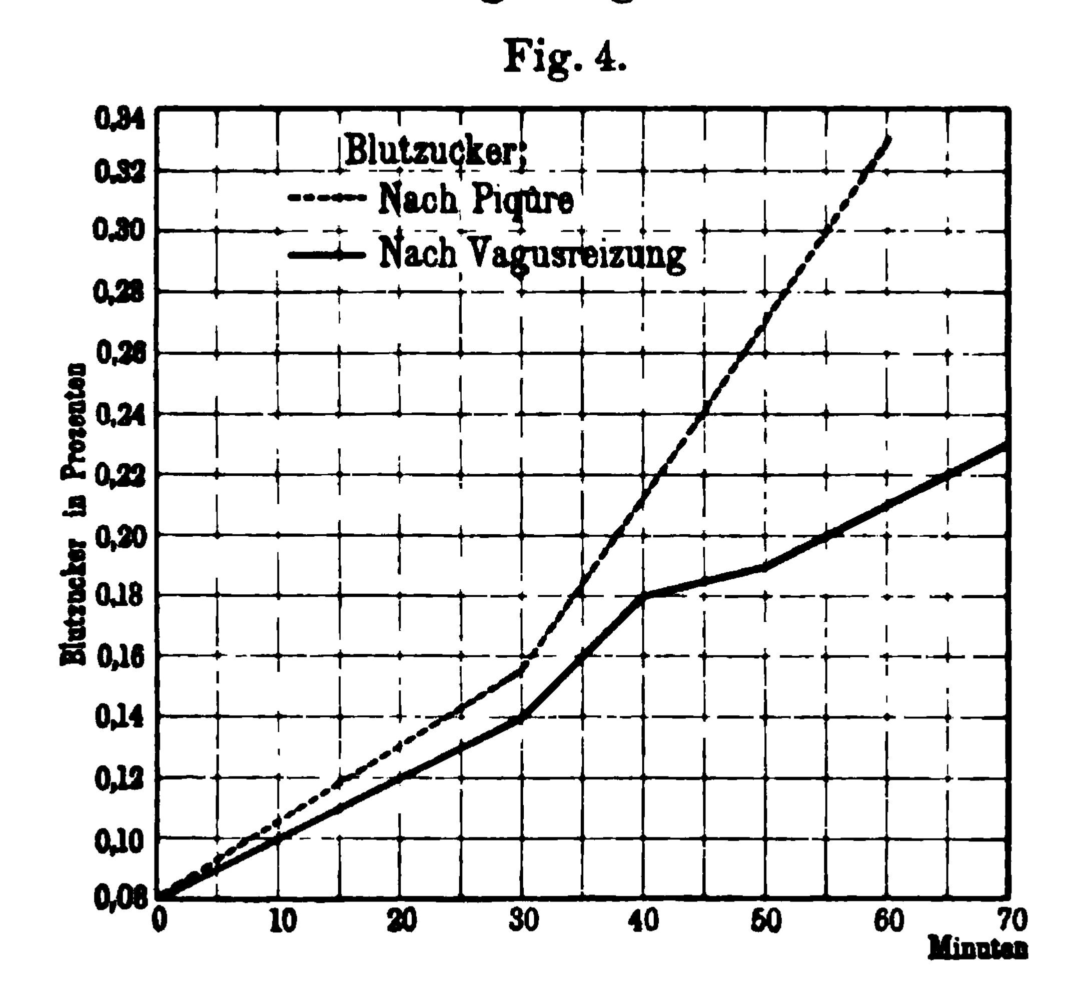
Besonders in der ersten halben Stunde stimmen die Kurven beinahe vollständig überein. Was aber ferner in die Augen fällt, ist die Tatsache, daß der Zuckergehalt nicht die klassischen 0,3 Proz. erreicht, welche bekanntlich notwendig sein sollen, um Glykosurie hervorzurufen. In den Versuchen Nr. 115 und 117 aber war der Harnzuckergehalt höher als 0,5 Proz., und trotzdem

[1]) Die Tiere wurden nach Eckhard, aber nur schwach elektrisch gereizt.

hatte der Blutzuckergehalt kaum 0,20 Proz. überschritten. Inwieweit man dies als eine Nierenwirkung deuten darf, ist aber höchst unsicher, denn man darf wahrscheinlich Cl. Bernards altem Postulat nicht entscheidende Bedeutung beimessen. Wir lassen deswegen diese Frage offen.

Wenn die beiden Kurven auch anfangs — in der ersten halben Stunde — ganz genau übereinstimmen, ist der spätere Verlauf derselben durchaus verschieden. Nach Vagusreizung erfolgt das Ansteigen regelmäßig, während bei Piqûre die Kurve nach der ersten halben Stunde steil emporsteigt. Diese Tatsache, welche durch ziemlich zahlreiche Versuche sichergestellt ist, kann man vielleicht als eine Bestätigung unserer Befunde betreffs der Fermentproduktion deuten.

Fig. 4.



Die Kurve nach Vagusreizung zeigt an, daß eine konstante, obwohl ziemlich geringe Zuckerbildung während der ganzen Zeit vorliegen muß. Von den 19 Versuchen, Nr. 89 bis 107, ergeben nur drei eine etwas vermehrte Fermentproduktion (Versuche Nr. 90, 103 und 105 mit 10,0, 10,5 und 15,1 Proz. Umsatz). In den ersten 50 Minuten liegt also keine vermehrte Zuckerbildung der Leber vor. Wenn hier eine anfängliche Fermentproduktion vorkäme, dürfte die Kurve keinen so regelmäßigen Verlauf aufweisen. Auf der anderen Seite ist jedoch der Blutzuckergehalt nach einer halben Stunde auf das Doppelte und nach einer Stunde auf das Dreifache vermehrt.

Es fragt sich daher, woher stammt die Vermehrung des Blutzuckers nach Vagusreizung. Es ist ganz klar, daß wir durch Erledigung dieser Frage zugleich willkommenes Material zur Beurteilung unserer Auffassung erhalten.

Vor allem kann man an die Leber denken, die nach Seegen neben Glykogen noch andere Kohlehydratbildner enthält. Wir müssen aber entschieden bezweifeln, daß die Leber bei der Glykosurie nach Vagusreizung überhaupt beteiligt ist. Zwar haben

wir keine Zuckerbestimmungen der Leber ausgeführt, haben aber Grund, anzunehmen, daß in diesem Falle kein nennenswerter Zuckergehalt der Leber vorlag. Bei unseren zahlreichen Versuchen haben wir keine geringe Übung gewonnen, schon aus der Farbe der nach dem Zerkochen der Leber mit KOH erhaltenen Lösung auf die Zuckerproduktion zu schließen. Ist eine solche vorhanden, so ist die Lösung mehr oder minder stark braun gefärbt (Mooresche Probe), während die Kontrollprobe gelb-gelbbraun ist. Liegt keine nennenswerte Zuckerproduktion vor, so zeigen die beiden Proben ungefähr dieselbe Farbennuance. Da wir nun in den betreffenden Versuchen keine Braunfärbung bemerkten, mußten wir annehmen, daß keine nennenswerte Zuckermenge gebildet ist. Hieraus haben wir die Folgerung gezogen, daß man die Herkunft der Hyperglykämie außerhalb der Leber suchen muß.

Es lag der Versuch nahe, diese Frage durch Untersuchungen an Hungertieren zu beantworten. Schon Cl. Bernard hat gezeigt, daß der Zuckerstich an Hungertieren, welche das Leberglykogen verbraucht haben, wirkungslos bleibt. Wenn es sich beweisen ließ, daß solche Tiere, welche kein oder wenig Glykogen besitzen, trotzdem nach Vagusreizung eine Hyperglykämie bzw. Glykosurie bekommen, war erstens unsere Auffassung über die Nichtbeteiligung der Leber bewiesen, und zweitens ließ sich vielleicht hieraus weitere Auskunft über Ort und Material der Zuckerbildung gewinnen.

Wir werden in dem Folgenden über solche Versuche berichten. Wir stellen sie in der folgenden Tabelle zusammen.

Tabelle XII.

Versuchs-Nr.	Hungertage	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Harnzucker	Blut entnommen g	Blutzucker Proz.
119	2	1900	80	0,16	0,2	+	31,56	vermehrt
120	2	2600	126	0,23	0,2	0	34,35	0,13
121	2	2900	96	0,52	0,5	—	35,00	0,16
122	3	1300	55	0,05	0,1	—	31,60	0,16
123	4	2900	96	0,54	0,6	+	43,22	vermehrt
124	7	2500	76	0	0	0	53,24	nicht verm.

Vorerst sei bemerkt, daß sämtliche Versuchstiere während einer Stunde nach Eckhard gereizt wurden; nur im Versuche Nr. 120 wurde Blut (und Leber) nach einer halben Stunde entnommen. Bei sämtlichen Tieren wurde

Blut zur Zuckerbestimmung entnommen. In den Versuchen Nr. 119, 123 und 124 wurde der Zucker nach Fehling bestimmt. Da ich aber diese Methode zur Bestimmung derartig kleiner Zuckerquantitäten nicht für genügend zuverlässig erachte[1]), will ich die Ergebnisse nicht anführen. Nur so viel geht mit Bestimmtheit daraus hervor, daß der Blutzuckergehalt in den Versuchen Nr. 119 und 123 vermehrt war. In dem Versuche Nr. 124 kam dagegen keine Vermehrung vor. In den übrigen Versuchen Nr. 120, 121 und 122 ist der Blutzucker nach meiner Methode bestimmt. In mehreren der Versuche reduzierte der Harn. Ich lege übrigens keinen Wert darauf, da der Harn immer dunkel gefärbt, konzentriert war und die Differenzen vor und nach der Reizung, wie man sieht, nicht groß waren.

Um so größeres Gewicht darf man der Bestimmung des Blutzuckers beimessen. Besonders im Versuche Nr. 122 enthält die Leber nur 0,05 g Glykogen (als Zucker berechnet), und dessen ungeachtet ist der Blutzuckergehalt auf 0,16 Proz., d. h. auf das Doppelte der Norm, gestiegen. Das Tier wiegt 1300 g und enthält demgemäß etwa 100 g Blut; folglich ist etwa 0,08 g Zucker oder beinahe doppelt so viel, als dem Glykogenzucker der Leber entspricht, neu gebildet. Es ist hierbei nicht berücksichtigt, daß wahrscheinlich etwas Zucker ausgeschieden ist, und ferner nicht, daß eine Verbrennung von Zucker stattgefunden hat. Für den Versuch Nr. 119 trifft dasselbe zu. Gegen diese Auffassung kann man einwenden, daß vielleicht die Leber unmittelbar vor der Reizung mehr Glykogen enthalten hätte, und daß es folglich nicht erlaubt ist, den geringen gefundenen Glykogengehalt in Rechnung zu setzen. Dagegen muß man erstens berücksichtigen, daß die letzten Spuren — und von mehr als Spuren kann hier nicht die Rede sein — nur langsam aus der Leber verschwinden, also kaum während einer Stunde. Ferner habe ich auch im Versuch Nr. 120 den Glykogenumsatz direkt bestimmt. (Der Leberbrei wurde mit 10 proz. Glykogenlösung versetzt.) In 4 Stunden wurden 14 Proz. umgesetzt (wie bei Hungerkaninchen, siehe erste Mitteilung). In einer halben Stunde ist der Blutzuckergehalt auf 0,13 Proz. oder von 160 auf 260 mg Dextrose gestiegen, davon können nur 30 mg aus der Leber herstammen, wenn man die sicher unwahrscheinliche Annahme macht, daß in einer halben Stunde intravital ebenso viel umgesetzt wird, wie in vitro während 4 Stunden.

Die Versuche haben folglich das übereinstimmende Ergebnis geliefert, daß die Leber bei der Bildung des Blutzuckers

[1]) Aus diesem Grunde sind mehrere Blutzuckerbestimmungen bei der Piqûre unberücksichtigt geblieben, obwohl die Ergebnisse mit den hier mitgeteilten gut stimmten.

nicht oder jedenfalls nur zum geringsten Teil beteiligt sein kann. Diese Tatsache tritt noch überzeugender hervor, wenn man den Blutzuckergehalt nach Vagusreizung bei gut ernährten und Hungertieren vergleicht.

Tabelle XIII.

Zeit nach Vagus-durchschneidung	Blutzuckergehalt	
	a) bei gut ernährten Tieren	b) bei Hungertieren
Min.	Proz.	Prom.
30	0,14	0,13
50—60	0,20	0,16

Wie man sieht, ist der Blutzuckergehalt nach der ersten halben Stunde in beiden Fällen derselbe und auch in der zweiten nur unwesentlich verschieden. Hieraus läßt sich die Folgerung ziehen: Nach Vagusreizung steigt der Blutzuckergehalt in ungefähr demselben Maße an, gleichgültig, ob die Leber viel Glykogen oder nur Spuren davon enthält.

Hieraus geht ferner hervor, daß das Kohlehydratmagazin, welches den Blutzucker liefert, auch nach 2 bis 3 Tagen Hunger nicht erschöpft ist, während dies mit dem Leberglykogen der Fall ist. Im Versuch Nr. 124 ist gezeigt, daß der Blutzucker in diesem Falle nach 7 Tagen Hunger nicht mehr durch Vagusreizung vermehrt wird.

Es fragt sich nun, welches Kohlehydratmagazin es sein kann, das nach 2 bis 4 Tagen nicht erschöpft ist, wohl aber nach 7 Tagen. Als solches kommt nach dem gegenwärtigen Standpunkte unserer Kenntnisse vor allem der Muskel in Betracht. Auf der einen Seite stellt das Muskelglykogen neben dem Leberglykogen den einzigen erheblichen Vorrat stickstofffreier Kohlehydrate dar. Und auf der anderen Seite ist es bekannt, daß das Muskelglykogen bei Hunger länger als das Leberglykogen fortbesteht. Aus den bekannten Versuchen von Külz geht diese Tatsache ganz deutlich hervor. Trotzdem man gegen die Versuchsanordnung und Methodik der Versuche von Külz manches einwenden kann und man weiter selbstverständlich nicht ohne weiteres seine an Tauben und Hühnern gewonnenen Ergebnisse auf Kaninchen übertragen darf, so besitzen sie doch für diese Auffassung solche Bedeutung, daß ich mir erlaube, einige Data anzuführen.

Tabelle XIV (nach Külz).

Hungertage	Gesamtglykogen der Leber g	Gesamtglykogen der Muskulatur g	Hungertage	Gesamtglykogen der Leber g	Gesamtglykogen der Muskulatur g
2	0	0,34	5	0	0,49
2	0	0,33	6	0	0,28
3	0,004	0,43	7	0	0,17
3	0	0,41	7	0	0,16
4	0	0,12	7	0	0,18
4	0	0,29	8	0	0,25

Wie ersichtlich, ist der Glykogengehalt der Muskulatur nach 2 bis 3 Tagen Hunger noch so groß, daß man sehr wohl hieraus die Hyperglykämie erklären kann. Es kann auch nicht befremden, daß diese Hyperglykämie in unserem Falle nach 7 Tagen Hunger ausgeblieben ist.

Wir dürfen in diesem Zusammenhange nicht unterlassen, darauf hinzuweisen, daß auch die Muskulatur ein entsprechendes diastatisches Ferment besitzt, welches in Übereinstimmung mit dem Verhalten in der Leber das Muskelglykogen umsetzen kann. Ein solches Ferment im Muskel ist schon von Magendie und später von vielen anderen Forschern nachgewiesen worden, und auch wir haben sein Vorkommen konstatieren können.

Durch die angeführten Untersuchungen sehe ich mit Wahrscheinlichkeit als bewiesen an, daß die elektrische Reizung des Vagus nicht, wie Cl. Bernard und alle nach ihm angenommen haben, eine reflektorische Erregung des Zuckerzentrums der Leber bewirkt, sondern die eines bis jetzt völlig unbekannten Zuckerzentrums für das Muskelglykogen, das auch örtlich von dem gewöhnlichen Zuckerzentrum getrennt sein muß[1]).

Unsere Kenntnis über den Glykogenumsatz im Muskel ist bekanntlich äußerst gering, und die Möglichkeit, daß das Muskelglykogen zu der Blutzuckerproduktion beitragen kann und dies auch tut, hat sich bis jetzt dem experimentellen Nachweise entzogen. Die Bedeutung des Muskelglykogens für das Auftreten einer Glykosurie und für die Diabeteslehre ist deswegen noch nicht ernstlich diskutiert worden.

---

[1]) Hiermit soll nicht gesagt sein, daß das Zuckerzentrum des Muskels nicht auch bei der Piqûre erregt wird und daß demgemäß der Harnzucker hier bloß aus der Leber und nicht auch aus Muskelglykogen herstammen kann.

Wir haben uns bis jetzt mit der initialen Wirkung der Vagusreizung beschäftigt, und der oben formulierte Hauptsatz betrifft nur diese. Wenn wir den weiteren Verlauf der Kurve Fig. 3 untersuchen, bemerken wir ein fortlaufendes Absinken, bis das Minimum, 4,7 Proz. Umsatz, 30 Minuten nach der Reizung erreicht wird. In Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei der Piqûre fragt es sich dann, ob das Sinken einen Ausschlag des Hemmungszentrums bedeutet. Dementsprechend könnte man sich ja auch vorstellen, daß dieses Hemmungszentrum überhaupt gleich von Anfang erregt worden war und daß später, d. h. nach einer halben Stunde, das gewöhnliche Zuckerzentrum à son tour gereizt wurde. Wir dürfen hervorheben, daß derzeit eine solche Auffassung jedenfalls nicht die initiale Zuckerbildung erklären kann. Nach meiner Ansicht ist aber eine solche initiale Hemmung, obwohl nicht ausgeschlossen, doch nicht erwiesen. Die Differenzen zwischen dem Glykogenumsatz gleich nach der Reizung und 30 Minuten später sind so klein, daß sie innerhalb der Zahlengrenzen liegen, und man ist deswegen berechtigt anzunehmen, daß die Fermentquantität der Leber diese ganze Zeit unverändert geblieben ist. Die Leber wird überhaupt nicht von der Reizung berührt.

Während der folgenden 20 Minuten steigt auch die Fermentproduktion durchschnittlich nur unbedeutend, und man kann deswegen annehmen, daß in den meisten Fällen auch während dieser Zeit die Leber nicht erregt wird.

Vereinzelt kommt auch hier eine Fermentproduktion der Leber vor, welche sonst gewöhnlich erst nach einer Stunde zustande kommt. Zu diesem Zeitpunkte ist aber eine vermehrte Fermentproduktion der Leber unbestreitbar nachgewiesen.

Es fragt sich dann, ob diese Fermentproduktion von der Durchschneidung oder Erregung abhängig ist. Es wäre denkbar, daß die elektrische Reizung in dieser Beziehung von dem Effekte der Durchschneidung verschieden ist.

Diese Tatsache kann eine prinzipielle Bedeutung besitzen. Es fragt sich nämlich, ob der nach Nervenreizungen auftretende Diabetes eventuell ein myogener ist oder nicht.

Wir haben diese Frage in der Weise zu beantworten versucht, daß wir die Vagusreizung ohne vorangehende Durchschneidung ausführten und nach einer Stunde die Leber exstirpierten.

Zunächst war es notwendig, festzustellen, ob die Reizung des peripheren Vagusstumpfes eine Fermentproduktion bewirkt. Nach

Cl. Bernards Untersuchungen war dies von vornherein nicht wahrscheinlich, und da schon der erste Versuch ein damit stimmendes Ergebnis gab, haben wir uns hiermit begnügt.

Tabelle XV.

Versuchs-Nr.	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Umsatz Proz.
125	102	3,3	3,3	13,4

Der Umsatz von 13,4 Proz. eine Stunde nach der Durchschneidung läßt sich aus der Durchschneidung allein erklären, und die elektrische Erregung hat demgemäß augenscheinlich kaum Einfluß gehabt.

Wenn also die Reizung des peripheren Stumpfes an sich keine Fermentproduktion bzw. Hemmung einer solchen bewirkt, dürfte die Wirkung einer Reizung des unverletzten Vagus einer zentripetalen Erregung entsprechen. Wir gehen hiermit zu den Versuchen über.

Tabelle XVI.

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Umsatz Proz.	Harn-zucker
126	1600	82	10,0	12,2	10,9	—
127	2200	120	13,5	11,5	12,9	+++
128	1600	126	19,1	15,6	9,3	+
	Durchschnittlich . .		14,2	—	11,0	—

Wir können demgemäß behaupten, daß die elektrische Reizung des Vagus an sich nach einer Stunde zu einer vermehrten Fermentproduktion führt.

Wenn nun nach unseren Ermittelungen in der ersten Stunde hauptsächlich das Muskelglykogen umgesetzt wird, das Leberglykogen zunächst nicht oder nur in sehr geringem Maße, nach dieser Zeit aber auch das Leberglykogen angegriffen wird, so möchten wir doch nicht annehmen, daß dieser Umsatz des Leberglykogens auch rein reflektorisch von dem Vagus bewirkt ist. Es wäre doch sehr eigentümlich, wenn die Erregung zu einem augenblicklichen Umsatz des Glykogens im Muskel, nicht aber in der Leber genügte.

Vielmehr möchten wir einer anderen Erklärung zuneigen. Wenn die Vorräte des Muskels in Anspruch genommen sind, „muß er imstande sein, nach der großen Vorratskammer zu telegraphieren, damit ihm neuer Nährstoff zugeschickt werde“. (Pflüger.)

Nach dieser Auffassung wäre die Zuckerproduktion der Leber auch eine reflektorische, ohne aber von der Nervenreizung auszugehen. Im Gegenteil, sie wäre als ein sekundärer Vorgang anzusehen, indem der Reflex von dem Muskel ausgeht. Hier im Muskel liegt die primäre Zuckerbildung vor, und von hier geht auch die durch den Verbrauch des Muskelglykogens ausgelöste Order zur Zuckerproduktion in der Leber aus. Oder, mit Pflüger zu sprechen: „Wir erkennen in dieser wunderbar zweckmäßigen Einrichtung die Äußerung des von mir (Pflüger) aufgestellten Gesetzes der Selbststeuerung.“

Die nach Vagusreizung auftretende Glykosurie kann infolgedessen wesentlich als ein Muskeldiabetes angesehen werden.

Ebenso wie die Reizung des Vagus Glykosurie bewirkt, ist das auch bei der Reizung vieler anderer Nerven der Fall. Die elektrische Reizung des zentralen Ischiadicusstumpfes bewirkt Glykosurie, aller Wahrscheinlichkeit nach von derselben Kategorie wie die Vagusreizung. Külz und Schiff beobachteten nach Durchschneidung des Ischiadicus Zuckerausscheidung, welche nach Reizung des zentralen Stumpfes noch stärker wurde.

Ebenso wie die elektrische Erregung zu Zuckerproduktion führt, ist das auch bei verschiedenen anderen Erregungen der Nerven der Fall. Eine solche Erregung, welche zuweilen zu einer Zuckerausscheidung führt, wird durch entzündliche Prozesse der Nerven, das Vorhandensein von Fremdkörpern, Tumoren usw. veranlaßt. Recht oft wird Glykosurie als Begleiterscheinung von Ischias beschrieben. Davon sind interessante Beispiele in Pflügers Glykogenbuch, S. 402, angeführt. S. 403 findet man weiter solche Diabetesfälle nach anderen Erregungen der Nerven mitgeteilt. Man kann deswegen Pflüger beistimmen, wenn er nach Besprechung der Fälle folgert, daß Diabetes durch Nervenreizung, und zwar von den verschiedensten Provinzen des Nervensystems aus, veranlaßt werden kann.

In Übereinstimmung mit unseren Befunden nach Vagusreizung glauben wir daher, daß man berechtigt ist, die nach Nervenreizung auftretende Glykosurie prinzipiell als einen Muskeldiabetes anzusehen, welcher dann einen Leberdiabetes, aber erst sekundär, bewirkt.

Gegenüber diesem Muskeldiabetes ist ferner der nach Erregung des zentralen Nervensystems auftretende Diabetes, z. B. nach Piqûre, Hirnerschütterung und wahrscheinlich bei Gehirntumoren, als ein primärer Leberdiabetes anzusehen. Man könnte das so ausdrücken:

Nach Reizung des peripheren Nervensystems entsteht ein Muskeldiabetes, nach Erregung des zentralen ein Leberdiabetes.

Gegen die Berechtigung einer solchen Klassifikation kann eingewandt werden, daß die zentrifugale Leitungsbahn von dem Zuckerzentrum durch den Sympathicus geht, und zwar zu der Leber, und daß man annimmt, daß der Reflex auch nach Vagusreizung demselben Wege folgt.

Hierzu ist zu bemerken, daß es sehr wohl möglich ist, daß der Sympathicus die zentrifugale Leitungsbahn auch zu den Muskeln darstellen kann, und daß auf der anderen Seite noch nicht bewiesen ist, daß in der Tat die Vagusreizung nach Durchschneidung des Sympathicus unwirksam bleibt. Untersuchungen hierüber sind deswegen wünschenswert.

Wir geben gern zu, daß fortgesetzte, umfassendere Untersuchungen unsere Ergebnisse in dem einen oder anderen Punkte modifizieren können, und wir können deshalb nur zu weiteren Untersuchungen auffordern. Wir haben nur auf Grund unserer Versuche die Auffassung, welche wir als die wahrscheinlichste ansehen, entwickelt. So viel sehen wir jedoch als bewiesen an, daß dem Muskelglykogen für die Diabeteslehre eine unter Umständen nicht zu unterschätzende Bedeutung zukommt.

Wir haben hiermit unsere Befunde bei verschiedenen Einwirkungen des Nervensystems mitgeteilt und die wahrscheinlichsten Schlußfolgerungen derselben gegeben. Wir glauben, die Ergebnisse auch als eine Bestätigung der Resultate ansehen zu dürfen, welche wir in unserer ersten Mitteilung veröffentlicht haben, ebenso wie die jetzt mitgeteilten Untersuchungen auf den früheren aufgebaut sind. In der folgenden dritten Mitteilung werden wir dies weiterzuführen versuchen, indem wir unsere Versuche über die Fermentproduktion nach verschiedenen Vergiftungen mitteilen.

Lund, 21. Februar 1907.

II.

Untersuchungen über den menschlichen Bauchspeichel und das Fermentgesetz des Trypsins.

Von **Otto Faubel.**

Aus dem chemischen Laboratorium und der inneren Abteilung des städtischen Luisenhospitals zu Dortmund (Oberarzt Privatdozent Dr. Volhard).

Bisher verfügten wir nur über indirekte Methoden, um Pankreassekretionsstörungen zu erkennen. Wir vermögen unter Umständen aus der Beschaffenheit der Faeces, aus einer starken Verschlechterung der Eiweiß- und Fettresorption einen Schluß auf eine Störung der Bauchspeichelabsonderung zu ziehen. Derartige Ausnutzungsversuche sind aber nur ausnahmsweise durchführbar, für die klinische Diagnostik deshalb ungeeignet und nicht einmal absolut eindeutig.

Für klinische Zwecke sind zwei Methoden zur Erkennung des Bauchspeichelausfalles empfohlen worden, die Sahlische Glutoidkapselmethode und die Schmidtsche Säckchenprobe.

Sahli[1]) gibt Jodoform in Kapseln aus einer formolgehärteten Gelatine, welche, gegen die Magenverdauung resistent, erst der Pankreasverdauung unterliegen soll, und schließt aus dem zeitlichen Auftreten der Jodreaktion auf die Pankreasfunktion.

Schmidt[2]) läßt Fleischwürfel eingenäht in Gazesäckchen schlucken und untersucht ihren Inhalt nach der Darmpassage mikroskopisch auf die Anwesenheit von Zellkernen, unter der Annahme, daß der Pankreassaft das einzige Sekret des Verdauungskanals ist, welches die Kernsubstanzen verdaut.

Schmidt[3]) hat bereits auf Grund sorgfältiger klinischer Beobachtung, exakter Untersuchung der Faeces und Anwendung der Säckchenprobe in einigen Fällen eine funktionelle Pankreasachylie annehmen zu dürfen geglaubt. Aber von einer wirklichen direkten

---

[1]) Deutsch. med. Wochenschr. 1897, Nr. 1 und Deutsch. Arch. f. klin. Med. 61, 445 (1898).
[2]) Verhandl. des Kongresses f. inn. Med. 21 (1904).
[3]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 87.

Funktionsprüfung dieses versteckt gelegenen Organes waren wir doch noch weit entfernt. Es ist jedoch jetzt, wie im folgenden gezeigt werden soll, möglich, mit verhältnismäßig geringer Mühe und ohne große Unbequemlichkeiten für den Untersuchten den Bauchspeichel des lebenden Menschen zu gewinnen und der Untersuchung zugänglich zu machen.

Die Methode zur Gewinnung des Pankreassaftes schließt sich an die Beobachtung von Pawlow und Boldireff[1]) an, welche beim Hunde einen Rückfluß von Galle und Pankreassaft in den Magen gesehen haben, wenn der Magen fette Speisen oder übermäßige Säure enthielt. Volhard hat nun gefunden, daß es auch beim Menschen gelingt, Pankreassaft mit oder ohne Galle zu gewinnen, wenn man mit der Schlundsonde 200 g Öl in den nüchternen Magen einführt und nach einer halben Stunde wieder aushebert. Diese Art der Gewinnung liegt allen nachstehend mitzuteilenden Verdauungsversuchen zugrunde.

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen, welche ich auf Anregung und unter Anleitung des Herrn Oberarztes Privatdozenten Dr. Volhard im chemischen Laboratorium des städtischen Luisenhospitals zu Dortmund im Laufe der letzten Monate angestellt habe, war zunächst festzustellen, ob es in der Mehrzahl der Fälle gelingt, mittels Öleingießung Pankreassaft zu gewinnen. Bei dieser Gelegenheit sollte außerdem noch einmal geprüft werden, ob bei der Trypsinwirkung die Verdauungsprodukte direkt proportional sind dem Produkt aus Fermentmenge und Verdauungszeit, wie dies in einer unter Volhards Leitung entstandenen Arbeit von Löhlein[2]) behauptet worden ist, oder ob das Trypsin, wie Pawlow annimmt, dem Schütz-Borissowschen Wurzelgesetz folgt, wonach die Produkte der Verdauung proportional sind der Quadratwurzel aus Fermentmenge und Verdauungszeit. Von vornherein sollte man auch für das Trypsin die Gültigkeit des Wurzelgesetzes erwarten, da das Pepsin, wie Schütz und Borissow dies nachgewiesen haben, und auch das fettspaltende Ferment des Magens und des Pankreas, wie Volhard[3]) und seine Schüler dargetan haben, dem Wurzelgesetz folgen.

Der aus dem Magen geheberte Ölmagensaft schied sich durchweg in eine obere Ölschicht und eine schwerere Saftschicht, welche

---

[1]) Congrès internat. des Physiologistes. Bruxelles 1904.

[2]) Diese Beiträge 7, Heft 1/3.

[3]) Volhard, 73. Naturforscherversammlung Hamburg; Stade, Diese Beiträge 3, Heft 7/8; Engel, ebenda 7, Heft 1/3.

im Scheidetrichter von der ersteren getrennt wurde. Dieser so isolierte Saft wurde mit $^{1}/_{10}$ n- oder $^{1}/_{4}$ n-Natronlauge bis zur schwach alkalischen Reaktion neutralisiert[1]).

Zum Trypsinnachweis diente die titrimetrische Methode von Volhard, wie sie auch Löhlein schon angewandt hat. Als Verdauungsflüssigkeit wurde die von Thomas und Weber angegebene und empfohlene Natroncaseïnlösung benutzt.

Deren Herstellung geschieht folgendermaßen: 100 g feinkörniges, aus der chemischen Fabrik Rhenania-Aachen bezogenes Caseïn werden in einer langhalsigen Kolbenflasche in 1 Liter destillierten Wassers unter Umschütteln eingeweicht, mit 80 ccm n-NaOH versetzt und mit Chloroformwasser auf 2000 ccm aufgefüllt. Unter häufigem Umschütteln wird auf dem Wasserbade langsam erwärmt, bis alles Caseïn völlig gelöst ist, und dann rasch auf 85 bis 90° C erhitzt, damit eventuell vorhandene Keime oder Fermente vernichtet werden. Nach dem Erkalten wird zur Fernhaltung schädlicher Keime aus der Luft ein wenig Toluol aufgeschüttet.

Eine so hergestellte Natroncaseïnlösung hält sich längere Zeit und bietet das Angenehme, daß man sie sowohl zu Trypsin- wie auch nach Zusatz von Salzsäure zu Pepsinversuchen verwenden kann.

Aus Zweckmäßigkeitsgründen, um ein schnelles Abmessen von 100 ccm zu ermöglichen, wurde die Natroncaseïnlösung in eine hochstehende, tubulierte Vorratsflasche umgegossen, deren Ausflußöffnung durch ein Gummirohr und ein in dieses eingeschaltetes ⊣-förmiges Glasrohr mit einer umgekehrt eingespannten 100 ccm-Pipette verbunden war, so daß mittels zweier Schlauchklemmen der Zufluß zur Pipette und von da das Abmessen von 100 ccm Caseïnlösung in die zu unseren Versuchen benutzten, langhalsigen und mit Marken von 300 und 400 ccm versehenen Verdauungsflaschen (von Wallach Nachfolger in Kassel zu beziehen) in bequemster Weise zu bewerkstelligen war.

Der einzelne Versuch gestaltete sich nun derart, daß ich in eine solche Flasche 100 ccm Natroncaseïnlösung einlaufen ließ, Chloroformwasser bis zur Marke 300 ccm auffüllte, eine mittels Pipette genau abgemessene Menge des auf Trypsin zu prüfenden, mit Natronlauge neutralisierten[1]) Ölmagensaftes hinzufügte und dann die Flasche in ein durch Toluolregulator genau bei 40° C gehaltenes Wasserbad für eine bestimmte Zeit einstellte. So vorbereitet, genügte eine Flasche zur qualitativen Trypsinbestimmung. Zwecks quantitativer Bestimmung wurden mehrere Flaschen wie oben vorbereitet, aber mit verschieden großen, genau bestimmten Ölsaftmengen versehen, für eine gleiche Zeitdauer ins Bad gesetzt.

---

[1]) Es ist, wie sich später herausgestellt hat, besser, die Neutralisation des Saftes zu unterlassen. Natürlich muß dann die halbe Acidität des Saftes von dem in 200 ccm Filtrat ermittelten Aciditätszuwachs abgezogen werden.

Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wurden die Flaschen dem Bade entnommen, mit genau 11 ccm n-HCl versetzt, und mit 20 proz. Na_2SO_4-Lösung bis zur Marke 400, die sich am Hals der Flasche befindet, aufgefüllt, wodurch die Trypsinverdauung zum Aufhören gebracht wurde. Dabei fällt das bis dahin unverdaute salzsaure Caseïn in Flocken aus, während die wasserlöslich gewordenen salzsauren Verdauungsprodukte ins Filtrat übergehen. Demgemäß ist der Caseïnniederschlag um so geringer und das Filtrat um so saurer, je mehr Caseïn verdaut wurde.

Thomas und Weber bestimmten gewichtsanalytisch die Abnahme des Filterrückstandes als Maß der Verdauung. Diese gewichtsanalytische Bestimmung ist aber sehr umständlich und wird sich deshalb nie einer allgemeinen Einführung erfreuen können. Ihr gegenüber läßt die Volhardsche Titriermethode an Einfachheit und Genauigkeit nichts mehr zu wünschen übrig. Volhard ging von der Überlegung aus, daß bei fortschreitender Verdauung der Caseïnlösung der Säurewert des Filtrats zunehmen müsse, da die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Verdauungsprodukte das Filter passieren, und wies nach, daß bei Anwendung derselben Mengen derselben sauren Caseïnlösung ohne Fermentzusatz der Säuregrad des Filtrats stets der gleiche und viel kleiner war, als dem wirklichen Säuregehalt der Stammlösung entsprach. Daraus geht hervor, daß unter gleichen Versuchsbedingungen im Caseïnniederschlag immer dieselbe Menge Salzsäure zurückbleibt und allein die freie Salzsäure ins Filtrat übergeht. Folglich muß man einen über den als konstant festgesetzten Säurewert der benutzten Stammlösung hinausgehenden Säurezuwachs beim Verdauungsversuch auf die ins Filtrat übergetretenen salzsauren Caseosen beziehen und darf mit Recht aus der Höhe des Säurezuwachses auf den Verdauungswert des angewandten fermenthaltigen Saftes schließen.

Jede Versuchsreihe wurde von einem blinden Versuch begleitet, d. h. es wurde für die gleiche Zeit mit den fermenthaltigen Flaschen eine Flasche mit Stammlösung — 100 ccm Natroncaseïnlösung + aqua chloroformata bis zur Marke 300 ohne Ölsaft — ins Bad gesetzt.

Nach Beendigung des Verdauungsversuches wurden genau 200 ccm des Filtrats einer jeden Flasche titriert und von der Acidität der fermenthaltigen Proben die Acidität der Stammlösung abgezogen. Die Acidität des Ölmagensaftes blieb außer Ansatz im Gegensatz zu Verdauungsversuchen mit Pepsin, weil dieselbe jedesmal vor Beginn des Versuches durch Neutralisation aufgehoben war.

1.

Zunächst lasse ich zwei Versuche folgen, welche dartun, daß ein nach oben beschriebener Methode gewonnener Ölmagensaft sowohl peptisch wie tryptisch wirksam sein kann. Zum Nachweise der peptischen Kraft hat man nur nötig, die Salzsäure — 11 ccm — der Mischung vor dem Versuche zuzufügen.

In beiden Versuchen betrug die Verdauungszeit 21 Stunden; titriert wurde mit $^1/_{10}$ n-NaOH. Hier wie überall diente als Indikator eine 2 proz. alkoholische Phenolphthaleïnlösung.

Die drei Zahlen bei jedem Flaschenversuch bedeuten den Grad des Umschlages in Spur, rosa und rot.

1. Versuch.

Stammlösung			Pepsin 5 ccm Ölsaft, nicht neutralisiert			Trypsin 5 ccm Ölsaft, durch 0,3 $^1/_{10}$ n-NaOH neutral.		
27,6	28,0	28,5	53,3	54,0	54,7	46,3	46,9	48,5
Ab Stammlösung			27,6	28,0	28,5	27,6	28,0	28,5
Ab Saftacidität			0,3	0,3	0,3	—	—	—
Säurezuwachs			25,4	25,7	25,9	18,7	18,9	20,0

2. Versuch.

Stammlösung			Pepsin 5 ccm Ölsaft, neutral. durch 0,1 $^1/_{10}$ n-NaOH			Trypsin 5 ccm Ölsaft, neutral. durch 0,1 $^1/_{10}$ n-NaOH		
27,6	28,0	28,5	45,5	46,45	48,2	34,85	35,3	36,7
Ab Stammlösung			27,6	28,0	28,5	27,6	28,0	28,5
Säurezuwachs			17,9	18,45	19,7	7,25	7,3	8,2

Wie oben erläutert, gibt uns der Säurezuwachs in beiden Versuchen an, wie weit die Verdauung durch die angewandten Fermentmengen vorgeschritten ist. Beide Male ist der peptische Wert höher als der tryptische.

2.

Die folgenden Versuche beweisen, daß die Verdauung mit Trypsin keine dem Schütz-Borissowschen Gesetze entsprechende Werte liefert, wonach sich die Aciditätszunahme der Filtrate bei

Zusatz verschiedener Mengen desselben Ferments unter gleichen Versuchsbedingungen wie die Quadratwurzeln aus den relativen Fermentmengen und den Verdauungszeiten verhalten sollen, also

$$A : A_1 : A_2 = \sqrt{f.t} : \sqrt{f_1.t_1} : \sqrt{f_2.t_2}.$$

Diese Regel habe ich für das Trypsin durch keinen der vielen im Laufe der letzten Monate angestellten Versuche bestätigt gefunden, vielmehr ergaben meine Versuche bei konstanten Verdauungszeiten, daß die tryptische Verdauung direkt proportional den Fermentmengen fortschreitet, d. h. die Aciditätszunahmen verhielten sich proportional den angewandten Saftmengen

$$A : A_1 : A_2 = f : f_1 : f_2$$

oder

$$\frac{a}{f} = k \text{ (konstant).}$$

3. Versuch.

Zunächst sei bemerkt, daß sich die über den Versuchsreihen angegebene Anzahl von Cubikcentimetern auf den absoluten Saftgehalt bezieht, nicht auf die Verdünnung.

30 ccm Ölmagensaft werden mit 0,4 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 60 ccm verdünnt, um eine genaue Abmessung zu ermöglichen.

Dauer der Digestion: 20 Stunden. Titriert mit $^1/_{10}$ n-NaOH.

Stammlösung			1 ccm neutr. Ölsaft			2 ccm neutr. Ölsaft			3 ccm neutr. Ölsaft		
23,8	24,0	24,25	30,3	30,55	31,1	37,0	37,42	38,2	43,15	43,75	44,8
Ab Stammlösung .			23,8	24,0	24,25	23,8	24,0	24,25	23,8	24,0	24,25
Säurezuwachs . .			6,5	6,55	6,85	13,2	13,42	13,95	19,35	19,75	20,55
$k = \frac{a}{f}$			6,5	—	—	6,6	—	—	6,45	—	—

Stammlösung			4 ccm neutr. Ölsaft			5 ccm neutr. Ölsaft		
23,8	24,0	24,25	(45,75)	46,25	47,8	(47,9)	48,55	50,0
Ab Stammlösung . . .			23,8	24,0	24,25	23,8	24,0	24,25
Säurezuwachs			21,95	22,25	23,55	24,1	24,55	25,75
$k = \frac{a}{f}$			(5,6)	—	—	(4,8)	—	—

4. Versuch.

12 ccm eines durch Öleingießung gewonnenen Magensaftes werden durch 2,2 $^1/_{10}$ n-NaOH neutralisiert und mit 9,8 ccm aqua destillata auf 24 ccm verdünnt.

Dauer: 16 Stunden. Titriert mit $^1/_4$ n-NaOH.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft			4 ccm Ölsaft		
9,4	9,5	9,55	10,7	10,75	10,85	12,0	12,15	12,3	13,3	13,6	13,9	14,4	14,75	15,1
Ab Stammlös.			9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55
Säurezuwachs			1,3	1,25	1,3	2,6	2,65	2,75	3,9	4,1	4,35	5,0	5,25	5,55
$k = \frac{a}{f}$ . . .			1,3	—	—	1,3	—	—	1,3	—	—	1,26	—	—

5. Versuch.

26 ccm von ebendemselben Ölmagensaft wie bei Versuch 4 wurden zwei Tage später zur Digestion benutzt, durch 1,65 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 52 ccm verdünnt.

Dauer: 16 Stunden. Titriert mit $^1/_4$ n-NaOH.

Stammlösung			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft			7 ccm Ölsaft			8 ccm Ölsaft		
9,4	9,5	9,55	12,3	12,4	12,55	12,4	12,7	12,9	13,15	13,5	13,8	13,35	13,6	13,9
Ab Stammlös.			9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55	9,4	9,5	9,55
Säurezuwachs			2,9	2,9	3,0	3,0	3,2	3,35	3,75	4,0	4,35	3,95	4,1	4,35
$k = \frac{a}{f}$ . . .			0,58	—	—	0,5	—	—	0,53	—	—	0,5	—	—

An diesen drei Tabellen erkennen wir, daß die Eiweiß spaltende Wirkung des Trypsins eine gleichmäßig fortschreitende ist und sich bei gleicher Zeitdauer verhält wie die angewandten Fermentmengen, und daß in jedem Versuch Säurezuwachs und Fermentmenge in einem konstanten Verhältnis stehen. Die geringen Abweichungen fallen in den Bereich der Fehlerquellen.

Daß in Versuchsreihe 4 und 5 die Aciditätswerte von dem mit 3 ccm Saft angestellten Versuche ab nicht mehr nennenswert ansteigen, ist begreiflich, da schon bei 3 ccm fast alles Caseïn verdaut ist und die in 200 ccm Filtrat in maximo enthaltene Salzsäuremenge nur $\frac{11 - 4}{2} = 3{,}5$ ccm n-HCl beträgt. (100 ccm Caseïnlösung in jeder Flasche enthalten 4 ccm n-NaOH. Diese 4 ccm sind von 11 ccm n-HCl abzuziehen, dann bleiben 7 ccm n-HCl und also in der Hälfte Filtrat 3,5 ccm n-HCl [1]).

In Versuch 4 und 5 handelt es sich um ein und denselben Ölmagensaft, der Versuch 5 liegt aber zwei Tage später als Ver-

[1]) Daß die Aciditätswerte noch weit höher steigen, liegt an der Bildung von organischen Säuren bei der Eiweißverdauung. Dem geht parallel das weite Auseinanderrücken der Umschläge in Spur, rosa, rot. Vgl. Volhard, Über das Alkalibindungsvermögen und die Titration der Magensäfte. Münchn. med. Wochenschr. 1903, Nr. 50.

such 4. Der Trypsingehalt hat stark abgenommen, dennoch bleibt der Quotient $\frac{a}{f}$ konstant. Danach verliert ein im sauren Magensaft vorhandenes Trypsin verhältnismäßig schnell an verdauender Kraft, auch wenn der Saft im Eisschrank aufbewahrt wird.

Nachfolgend teile ich das Ergebnis einer größeren Reihe von Untersuchungen von Ölmagensäften auf ihren tryptischen Wert mit. Die Versuche sind immer an denjenigen Tagen gemacht, an welchen die Säfte gewonnen waren. Jedem Hauptversuch ging ein qualitativer Probeversuch mit einer entsprechend größeren Saftmenge voraus.

6. Versuch.

Gastroenteritis. Ein nach Öleingießung gewonnener Magensaft erwies sich in tryptischer Beziehung als unwirksam. 5 ccm desselben wurden neutralisiert durch 1,9 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

7. Versuch.

Ulcus ventriculi. 40 ccm Ölsaft werden neutralisiert durch 8,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 80 ccm verdünnt.

Dauer: 15 Stunden. Titriert mit $^1/_{10}$ n-NaOH.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
17,5	17,6	17,8	19,1	19,2	19,4	20,8	21,0	21,2	22,3	22,5	22,8
Ab Stammlösung			17,5	17,6	17,8	17,5	17,6	17,8	17,5	17,6	17,8
Säurezuwachs . .			1,6	1,6	1,6	3,3	3,4	3,4	4,8	4,9	5,0
$k = \frac{a}{f}$			1,6	—	—	1,65	—	—	1,6	—	—

Stammlösung			4 ccm Ölsaft			9 ccm Ölsaft			16 ccm Ölsaft		
17,5	17,6	17,8	23,8	24,0	24,2	29,95	30,25	31,55	37,6	38,0	38,6
Ab Stammlösung			17,5	17,6	17,8	17,5	17,6	17,8	17,5	17,6	17,8
Säurezuwachs . .			6,3	6,4	6,4	12,45	12,65	13,75	20,1	20,4	20,8
$k = \frac{a}{f}$			1,58	—	—	(1,38)	—	—	(1,25)	—	—

Wir finden hier das Gesetz der regelmäßig fortschreitenden Trypsinverdauung bestätigt; allerdings versagt es bei zu groß gewählten Saftmengen.

8. Versuch.

Angina catarrhalis. Der Ölsaft, von welchem 45 ccm durch 3,75 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert wurden, war tryptisch unwirksam.

9. Versuch.

Auch hier — akuter Gelenkrheumatismus — verhielt sich der Ölsaft negativ.

10. Versuch.

Stomatitis. 25 ccm des Ölsaftes werden durch 2,05 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 50 ccm verdünnt.

Dauer: 20 Stunden. Titriert mit $^1/_4$ n-NaOH. Von jetzt ab titrierte ich bei den Versuchen immer nur mit $^1/_4$ n-NaOH.

Stammlösung	1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
7,2 | 7,4 | 7,6	8,05	8,2	8,3	8,75	8,9	9,05	8,8	9,1	9,3
Ab Stammlösung	7,2	7,4	7,6	7,2	7,4	7,6	7,2	7,4	7,6
Säurezuwachs . .	0,85	0,8	0,7	1,55	1,5	1,45	1,6	1,7	1,7
$k = \frac{a}{f}$	0,8	—	—	0,8	—	—	0,5	—	—

Stammlösung	4 ccm Ölsaft			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft		
7,2 | 7,4 | 7,6	7,2	7,4	7,65	9,5	9,7	9,9	10,25	10,45	10,65
Ab Stammlösung	7,2	7,4	7,6	7,2	7,4	7,6	7,2	7,4	7,6
Säurezuwachs . .	—	—	—	2,3	2,3	2,3	3,05	3,05	3,05
$k = \frac{a}{f}$	0	—	—	0,5	—	—	0,5	—	—

Die tryptische Kraft dieses Saftes ist sehr gering und ist fast gleich Null, bei der vierten Flasche sehen wir sogar einen gänzlichen Ausfall. Dies Verhalten vermag ich nur aus der gänzlich ungleichartigen Beschaffenheit des Ölsaftes zu erklären. Dieser war nämlich teils dünnflüssig, teils zähe, so daß der Abfluß aus dem Scheidetrichter zuweilen gänzlich stockte, auch enthielt er weißlich-graue Flocken, die anscheinend aus verschlucktem Schleim bestanden. Diese sehr ungleichmäßige Beschaffenheit des Saftes macht es wahrscheinlich, daß das Trypsinferment nicht gleichartig in demselben verteilt war, so daß in dem einen Falle mehr, in dem anderen weniger oder nur Schleim mit der Pipette abgehoben wurde.

11. Versuch.

Leichte Mitralinsuffizienz. Der Ölmagensaft war tryptisch unwirksam.

12. Versuch.

Bronchitis acuta. Auch hier war der Erfolg negativ. 5 ccm des Saftes wurden neutralisiert durch 0,4 $^1/_4$ n-NaOH.

13. Versuch.

Perityphlitis chronica. 13 ccm Ölmagensaft wurden neutralisiert durch 1,95 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 26 ccm verdünnt. Dauer: 24 Stunden. Titriert mit $^1/_4$ n-NaOH.

Stammlösung			0,5 ccm Ölsaft			1 ccm Ölsaft			1,5 ccm Ölsaft		
7,5	7,6	7,75	7,55	7,65	7,8	7,6	7,65	7,75	7,55	7,65	7,8
Ab Stammlösung			7,5	7,6	7,75	7,5	7,6	7,75	7,5	7,6	7,75
Säurezuwachs . .			0,05	0,05	0,05	0,1	0,05	—	0,05	0,05	0,05

Stammlösung			2 ccm Ölsaft			2,5 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
7,5	7,6	7,75	7,55	7,7	7,85	7,6	7,9	8,05	7,85	7,95	8,1
Ab Stammlösung			7,5	7,6	7,75	7,5	7,6	7,75	7,5	7,6	7,75
Säurezuwachs . .			0,05	0,1	0,05	0,1	0,3	0,1	0,35	0,35	0,35

Der Versuch ist als negativ anzusehen.

14. Versuch.

Gelenkrheumatismus. 5 ccm Ölmagensaft werden durch 0,3 ccm $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und auf 20 ccm mit aqua destillata verdünnt. Dauer: 23 Stunden.

Stammlösung			0,5 ccm Ölsaft			1 ccm Ölsaft			1,5 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft		
7,7	7,9	8,0	7,8	7,9	8,1	7,9	8,1	8,2	8,0	8,1	8,4	8,1	8,2	8,4
Ab Stammlösung			7,7	7,9	8,0	7,7	7,9	8,0	7,7	7,9	8,0	7,7	7,9	8,0
Säurezuwachs . .			0,1	—	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,4	0,3	0,4
$k = \frac{a}{f}$			0,1	—	—	0,1	—	—	0,1	—	—	0,1	—	—

15. Versuch.

Motorische Insuffizienz des Magens. 30 ccm des grünlichgelben, gleichmäßig dünnflüssigen Ölmagensaftes werden durch 3,0 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 60 ccm verdünnt. Dauer: 16$^1/_2$ Stunde.

Stammlösung			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft			4 ccm Ölsaft		
7,8	7,9	8,0	8,5	8,6	8,8	8,7	8,8	8,9	9,0	9,15	9,4
Ab Stammlösung			7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Säurezuwachs . .			0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,9	1,2	1,25	1,4
$k = \frac{a}{f}$			0,35	—	—	0,3	—	—	0,3	—	—

Stammlösung			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft			9 ccm Ölsaft		
7,8	7,9	8,0	9,3	9,4	9,6	9,55	9,7	9,8	10,2	10,3	10,55
Ab Stammlösung			7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Säurezuwachs . .			1,5	1,5	1,6	1,75	1,8	1,8	2,4	2,4	2,55
$k = \frac{a}{f}$			0,3	—	—	0,29	—	—	0,27	—	—

16. Versuch.

Hyperacidität. 25 ccm des gelbweißen Ölmagensaftes werden neutralisiert durch 1,8 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 50 ccm verdünnt. Dauer: 16$^1/_2$ Stunden.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
7,8	7,9	8,0	8,6	8,7	8,8	9,4	9,55	9,7	10,7	10,8	11,1
Ab Stammlösung			7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Säurezuwachs . .			0,8	0,8	0,8	1,6	1,65	1,7	2,9	2,9	3,1
$k = \frac{a}{f}$			0,8	—	—	0,8	—	—	0,97	—	—

Stammlösung			4 ccm Ölsaft			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft		
7,8	7,9	8,0	10,9	11,0	11,3	11,8	11,9	12,2	12,5	12,7	12,8
Ab Stammlösung			7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Säurezuwachs . .			3,1	3,1	3,3	4,0	4,0	4,2	4,7	4,8	4,8
$k = \frac{a}{f}$			0,77	—	—	0,8	—	—	0,78	—	—

17. Versuch.

25 ccm Ölmagensaft — Muskelrheumatismus — weißlich, opaleszierend, schleimig, stark fadenziehend, werden neutralisiert durch 1,5 ccm $^1/_4$ n-NaOH. Der Saft ist tryptisch unwirksam. Das Ergebnis des Testversuches war:

Stammlösung			5 ccm Ölsaft		
8,2	8,3	8,4	8,1	8,2	8,4

18. Versuch.

Hyperacidität. 30 ccm des dunkeln Ölmagensaftes werden neutralisiert durch 2,6 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 60 ccm verdünnt. Dauer: 23 Stunden.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft			4 ccm Ölsaft		
8,2	8,3	8,4	12,2	12,4	12,8	16,4	16,6	17,2	20,1	20,5	21,3	24,3	26,0	27,7
Ab Stammlösung			8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4
Säurezuwachs . .			4,0	4,1	4,4	8,2	8,3	8,8	11,9	12,2	12,9	16,1	17,7	19,3
$k = \frac{a}{f}$			4,0	—	—	4,1	—	—	3,97	—	—	4,02	—	—

Stammlösung			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft			7 ccm Ölsaft		
8,2	8,3	8,4	28,2	28,6	30,4	28,9	32,2	34,1	30,5	31,3	33,2
Ab Stammlösung			8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4
Säurezuwachs . .			20,0	20,3	22,0	20,7	23,9	25,7	22,3	23,0	24,8
$k = \frac{a}{f}$			4,0	—	—	(3,4)	—	—	(3,2)	—	—

19. Versuch.

20 ccm eines grünlichen, trüben, dünnflüssigen Ölmagensaftes — Lumbago — werden neutralisiert durch 2,8 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 40 ccm verdünnt. Der Testversuch von einstündiger Dauer mit 5 ccm Ölsaft fiel fast negativ aus.

Stammlösung			5 ccm Ölsaft		
8,5	8,65	8,84	8,6	8,8	9,0

20. Versuch.

32 ccm Ölmagensaft — geringe Nephritis und Alkoholismus — werden durch 1,0 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 64 ccm verdünnt. Der Saft hatte ein helles, wasserähnliches Aussehen. Dauer: 20 Stunden.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
8,2	8,3	8,4	13,1	13,3	13,8	17,5	18,3	19,2	19,9	21,1	22,4
Ab Stammlösung			8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4
Säurezuwachs . .			4,9	5,0	5,4	9,3	10,0	10,8	11,7	12,8	14,0
$k = \frac{a}{f}$			4,9	—	—	4,65	—	—	3,9	—	—

Stammlösung	4 ccm Ölsaft			5 ccm Ölsaft			6 ccm Ölsaft		
8,2 | 8,3 | 8,4	22,5	23,4	23,8	22,5	23,5	24,4	22,6	23,6	24,4
Ab Stammlösung	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4	8,2	8,3	8,4
Säurezuwachs . .	14,3	15,1	15,4	14,3	15,2	16,0	14,4	15,3	16,0
$k = \frac{a}{f}$	(3,6)	—	—	(3,0)	—	—	(2,6)	—	—

21. Versuch.

10 ccm eines wasserhellen, fadenziehenden Ölmagensaftes werden durch 0,45 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Dauer: 21 Stunden.

Stammlösung	0,25 ccm Ölsaft			0,5 ccm Ölsaft			0,75 ccm Ölsaft			1 ccm Ölsaft		
8,5 | 8,65 | 8,85	9,3	9,6	9,9	10,2	10,5	10,9	11,0	11,3	12,2	11,9	12,2	13,4
Ab Stammlös.	8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85
Säurezuwachs	0,8	0,95	1,05	1,7	1,85	2,05	2,5	2,65	3,35	3,4	3,55	4,55
$k = \frac{a}{f}$ . . .	0,8	—	—	0,8	—	—	0,8	—	—	0,8	—	—

22. Versuch.

30 ccm Ölmagensaft werden neutralisiert durch 1,4 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 60 ccm verdünnt. Dauer: 19 Stunden.

Stammlösung	0,2 ccm Ölsaft			0,4 ccm Ölsaft			0,6 ccm Ölsaft			0,8 ccm Ölsaft		
9,0 | 9,2 | 9,4	10,3	10,5	10,75	11,5	11,8	12,0	12,8	13,2	13,4	14,3	14,6	15,0
Ab Stammlös.	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4
Säurezuwachs	1,3	1,3	1,35	2,5	2,6	2,6	3,8	4,0	4,0	5,3	5,4	5,6
$k = \frac{a}{f}$ . . .	1,3	—	—	1,25	—	—	1,27	—	—	1,32	—	—

23. Versuch.

20 ccm Ölmagensaft werden neutralisiert durch 1,4 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 40 ccm verdünnt. Dauer: 18 Stunden.

Stammlösung	0,2 ccm Ölsaft			0,4 ccm Ölsaft			0,6 ccm Ölsaft			0,8 ccm Ölsaft		
9,0 | 9,2 | 9,4	10,6	10,9	11,0	12,4	12,6	12,9	14,0	14,2	14,8	15,8	16,1	16,5
Ab Stammlös.	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4	9,0	9,2	9,4
Säurezuwachs	1,6	1,7	1,6	3,4	3,4	3,5	5,0	5,0	5,4	6,8	6,9	7,1
$k = \frac{a}{f}$ . . .	1,6	—	—	1,7	—	—	1,67	—	—	1,7	—	—

24. Versuch.

20 ccm Ölmagensaft werden durch 2,0 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 40 ccm verdünnt. Dauer: $16^1/_2$ Stunden.

Stammlösung			0,5 ccm Ölsaft			1 ccm Ölsaft			1,5 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft		
9,9	10,0	10,1	11,9	12,1	12,4	14,0	14,2	14,5	15,8	16,4	16,8	18,1	18,3	18,6
Ab Stammlös.			9,9	10,0	10,1	9,9	10,0	10,1	9,9	10,0	10,1	9,9	10,0	10.1
Säurezuwachs			2,0	2,1	2,3	4,1	4,2	4,4	5,9	6,4	6,7	8,2	8,3	8,5
$k = \frac{a}{f}$ . . .			2,0	—	—	2,05	—	—	1,97	—	—	2,05	—	—

25. Versuch.

10 ccm Ölmagensaft werden durch 0,2 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Dauer: 22 Stunden.

Stammlösung			0,5 ccm Ölsaft			1,0 ccm Ölsaft			1,5 ccm Ölsaft		
9,0	9,4	9,6	11,8	12,2	12,5	14,5	15,0	15,4	17,4	17,8	18,3
Ab Stammlösung			9,0	9,4	9,6	9,0	9,4	9,6	9,0	9,4	9,6
Säurezuwachs . .			2,8	2,8	2,9	5,5	5,6	5,8	8,4	8,7	8,7
$k = \frac{a}{f}$			2,8	—	—	2,75	—	—	2,8	—	—

Stammlösung			2 ccm Ölsaft			2,5 ccm Ölsaft		
9,0	9,4	9,6	20,2	20,6	21,2	23,0	23,5	24,05
Ab Stammlösung . . .			9,0	9,4	9,6	9,0	9,4	9,6
Säurezuwachs			11,2	11,2	11,6	14,0	14,1	14,45
$k = \frac{a}{f}$			2,8	—	—	2,8	—	—

26. Versuch.

10 ccm Ölmagensaft werden neutralisiert durch 0,25 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Dauer: 22 Stunden.

Stammlösung			0,1 ccm Ölsaft			0,2 ccm Ölsaft			0,3 ccm Ölsaft		
11,3	11,5	11,7	12,6	12,8	13,1	14,0	14,2	14,4	15,45	15,6	15,9
Ab Stammlösung			11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7
Säurezuwachs . .			1,3	1,3	1,4	2,7	2,7	2,7	4,15	4,1	4,2
$k = \frac{a}{f}$			1,3	—	—	1,35	—	—	1,38	—	—

Stammlösung			0,4 ccm Ölsaft			0,5 ccm Ölsaft			0,6 ccm Ölsaft		
11,3	11,5	11,7	16,7	17,0	17,4	18,1	18,3	18,8	18,9	19,1	19,4
Ab Stammlösung			11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7
Säurezuwachs . .			5,4	5,5	5,7	6,8	6,8	7,1	7,6	7,6	7,7
$k = \frac{a}{f}$			1,35	—	—	1,36	—	—	(1,27)	—	—

27. Versuch.

10 ccm Ölmagensaft werden neutralisiert durch 0,3 $^1/_4$ n-NaOH und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Dauer: 22 $^1/_2$ Stunden.

Stammlösung			0,25 ccm Ölsaft			0,5 ccm Ölsaft			0,75 ccm Ölsaft		
11,3	11,5	11,7	12,9	13,1	13,3	14,5	14,7	15,0	16,1	16,3	16,8
Ab Stammlösung			11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7
Säurezuwachs . .			1,6	1,6	1,6	3,2	3,2	3,3	4,8	4,8	5,1
$k = \frac{a}{f}$			1,6	—	—	1,6	—	—	1,6	—	—

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft		
11,3	11,5	11,7	17,8	17,9	18,4	21,9	22,2	22,7
Ab Stammlösung . . .			11,3	11,5	11,7	11,3	11,5	11,7
Säurezuwachs			6,5	6,4	6,7	10,6	10,7	11,0
$k = \frac{a}{f}$			1,62	—	—	(1,32)	—	—

28. Versuch.

5 ccm Ölmagensaft werden durch 0,1 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Dauer: 20 Stunden.

Stammlösung			0,25 ccm Ölsaft			0,5 ccm Ölsaft			0,75 ccm Ölsaft		
8,3	8,4	8,5	8,9	9,1	9,3	9,5	9,7	9,8	10,25	10,4	10,75
Ab Stammlösung			8,3	8,4	8,5	8,3	8,4	8,5	8,3	8,4	8,5
Säurezuwachs . .			0,6	0,7	0,8	1,2	1,3	1,3	1,95	2,0	2,25
$k = \frac{a}{f}$			0,6	—	—	0,6	—	—	0,65	—	—

29. Versuch.

Der einstündige Probeversuch mit 5 ccm Ölmagensaft hatte ein negatives Ergebnis.

30. Versuch.

Ebenso fiel hier der Testversuch negativ aus.

31. Versuch.

5 ccm Ölmagensaft werden durch 0,3 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 10 ccm verdünnt. Dauer: 20 Stunden.

Stammlösung			0,5 ccm Ölsaft			1 ccm Ölsaft			1,5 ccm Ölsaft		
8,3	8,4	8,5	13,8	14,0	14,5	15,35	15,5	15,9	17,8	18,0	18,3
Ab Stammlösung			8,3	8,4	8,5	8,3	8,4	8,5	8,3	8,4	8,5
Säurezuwachs . .			5,5	5,6	6,0	7,05	7,1	7,4	9,5	9,6	9,8
$k = \frac{a}{f}$			5,5	—	—	3,53	—	—	(3,2)	—	—

An diesem Beispiel, wie bei Versuch 20, erkennen wir zwar ein Anwachsen der Verdauungswerte bei zunehmenden Saftmengen, nicht aber eine direkte Proportionalität. Vielleicht sind die Saftmengen zu groß gewählt, der Versuch hat nur qualitativen Wert.

32. Versuch.

10 ccm eines wasserhellen, schleimigen, flockigen Ölmagensaftes werden durch 0,3 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Das Versuchsergebnis war ein zweifelhaftes. Dauer: 21 Stunden.

Stammlösung			1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft			4 ccm Ölsaft		
8,5	8,65	8,85	8,7	8,9	9,1	9,3	9,5	9,9	8,9	9,1	9,5	8,8	9,0	9,3
Ab Stammlös.			8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85	8,5	8,65	8,85
Säurezuwachs			0,2	0,25	0,25	0,8	0,85	1,05	0,4	0,45	0,65	0,3	0,35	0,45
$k = \frac{a}{f}$ . . .			0,2	—	—	0,4	—	—	0,13	—	—	0,80	—	—

33. Versuch.

10 ccm Ölmagensaft werden durch 1,0 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 20 ccm verdünnt. Der qualitative Versuch von einstündiger Dauer hatte folgendes Ergebnis:

Stammlösung			5 ccm Ölsaft		
8,3	8,4	8,5	10,9	11,2	11,4

Der Versuch konnte quantitativ nicht durchgeführt werden, der Rest des Saftes ging verloren.

34. Versuch.

20 ccm Ölmagensaft werden durch 1,3 $^1/_4$ n-NaOH neutralisiert und mit aqua destillata auf 40 ccm verdünnt. Dauer: 20 Stunden.

Stammlösung	1 ccm Ölsaft			2 ccm Ölsaft			3 ccm Ölsaft		
7,8 7,9 8,0	8,2	8,3	8,4	8,6	8,75	8,9	8,9	9,1	9,5
Ab Stammlösung	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0	7,8	7,9	8,0
Säurezuwachs . .	0,4	0,4	0,4	0,8	0,85	0,9	1,1	1,2	1,5
$k = \frac{a}{f}$	0,4	—	—	0,4	—	—	0,4	—	—

Das Ergebnis meiner Reihenversuche zum Nachweis des Fermentgesetzes des Trypsin habe ich in beifolgender Tabelle zusammengestellt.

Nummer der Versuchsreihe	Angew. Menge Saft	$k = \frac{a}{f}$ Quotient aus Aciditätszuwachs in 200 Filtrat, dividiert durch die angewandten Saftmengen [1])							Verdauungszeit Std.
3	1—5	6,5	6,6	6,45	(5,6)	(4,8)	—	$^1/_4$ n-Lauge	20
4	1—4	1,3	1,3	1,3	1,26	—	—		16
7	1—4, 9, 16	1,6	1,65	1,6	1,58	(1,38)	(1,25)		15
15	2—6, 9	0,35	0,3	0,3	0,3	0,29	0,27		16$^1/_2$
16	1—6	0,8	0,8	0,97	0,77	0,8	0,78		16$^1/_2$
18	1—7	4,0	4,1	3,97	4,02	4,0	(3,4)	$^1/_4$ n-Lauge	23
20	1—6	4,9	4,65	(3,9)	(3,6)	(3,0)	(2,6)		20
21	0,25—1,0	0,8	0,8	0,8	0,8	—	—	1,0 Ölsaft macht demnach in 200 Filtrat eine Aciditätszunahme v. 3,2 $^1/_4$ n-Lauge	21
22	0,2—0,8	1,3	1,25	1,27	1,32	—	—	1,0 = 6,4	19
23	0,2—0,8	1,6	1,7	1,67	1,7	—	—	1,0 = 8,0	18
24	0,5—2,0	2,0	2,05	1,97	2,05	—	—	1,0 = 2,05	16$^1/_2$
25	0,5—2,5	2,8	2,75	2,8	2,8	2,8	—	1,0 = 2,75	22
26	0,1—0,6	1,3	1,35	1,38	1,35	1,36	(1,27)	1,0 = 13,6	22
27	0,25—2,0	1,6	1,6	1,62	(1,32)	—	—	1,0 = 6,0	22$^1/_2$
28	0,25—0,75	0,6	0,6	0,65	—	—	—	1,0 = 2,4	20

In meiner vorliegenden Arbeit ist als wichtigste die Tatsache hervorzuheben, daß wir nunmehr in der Lage sind, mittels eines Ölfrühstücks nach Volhard den Pankreassaft in der Mehrzahl der Fälle einer direkten Untersuchung zugänglich zu machen. Der

[1]) Oder deren Verhältniszahlen, so daß in der ersten Reihe die mit der kleinsten Saftmenge wirklich erhaltenen Aciditätszunahmen stehen.

Nachweis des Trypsins im Ölmagensaft gelang mir in 34 Fällen 24 mal, d. h. also in 70,6 Proz. der Fälle, und ich zweifle nicht daran, daß sich diese Zahl noch wesentlich erhöhen lassen wird, wenn man den bereits erwähnten Fehler vermeidet, die Ölsäfte gegen Phenolphthaleïn zu neutralisieren. Das Trypsin ist sehr empfindlich gegen den kleinsten Überschuß von Lauge.

In der Tabelle wie auch in den Versuchsreihen bedeuten die eingeklammerten Zahlen, daß die Verdauungsgrenze erreicht oder fast erreicht ist.

Meine Versuche ergeben weiter, daß das Schütz-Borissowsche Wurzelgesetz, wie es bei der Pepsin- und Steapsinverdauung zutrifft, bei dem Trypsin seine Gültigkeit nicht findet, daß hier vielmehr die Verdauung bei gleichen Verdauungszeiten direkt proportional den zugefügten Fermentmengen fortschreitet.

Bezeichnen wir die Menge der Verdauungsprodukte, die ich in meinen Versuchen als Säurezuwachs ermittelte, mit a, die Fermentkonzentration mit f, so verhält sich

$$a : a_1 : a_2 = f : f_1 : f_2.$$

Demgemäß ist auch $\frac{a}{f} = \frac{a_1}{f_1} = \frac{a_2}{f_2}$ oder $\frac{a}{f} = k$.

Schließlich geht aus meinen Versuchen noch hervor, daß die Fermentkonzentration des Ölmagensaftes und damit auch des Pankreassaftes in bezug auf das Trypsin bei den einzelnen Menschen eine recht verschiedene ist.

Zum Schlusse meiner Arbeit ist es mir ein Bedürfnis, Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. Volhard für die Anregung zu dieser Arbeit und für seine freundliche Hilfe meinen verbindlichsten und wärmsten Dank auszusprechen.

III.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

Sechste Mitteilung.

Die Hitzekoagulation von Säureeiweiß.

Von **Wolfgang Pauli.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften.)

Aus der biologischen Versuchsanstalt in Wien
(Physikalisch-chemische Abteilung).

1.

Unter der Einwirkung von Hitze erleiden gelöste genuine Eiweißkörper eine Zustandsänderung, welche unter bestimmten Umständen mit einer sichtbaren Flockenbildung verbunden ist. Bei dieser Hitzegerinnung wird der physikalische und chemische Charakter der Eiweißsubstanzen geändert. Über die Natur dieser Änderung und die Bedingungen ihres Eintritts existiert eine große Zahl weit zurückreichender Untersuchungen. Diese von der physikochemischen Seite her in einigen Punkten zu ergänzen, wurden die folgenden Versuche unternommen.

Die Hitzegerinnung von Eiweiß ist, einmal vollständig ausgebildet, nicht wieder durch Wärmeentziehung zurückzubilden. Doch soll, nach einer oft angeführten alten Angabe von Corin und Ansiaux[1]), durch Schütteln und Abkühlung eine Auflösung der Flocken im Moment ihres Entstehens möglich sein. Diese Art von Reversibilität kann auch noch anders, als dies oft geschieht, erklärt werden. Bei der Erhitzung einer nativen Eiweißlösung ohne besondere Vorsichtsmaßregeln, kommt es immer zu einer sehr ungleichmäßigen Erwärmung der Flüssigkeit. Dieselbe koagu-

[1]) Corin u. Ansiaux, Bulletin de l'Acad. roy. de Belg. 21.

liert an den Stellen höchster Temperatur zuerst unter Ausbildung einzelner Flocken, welche noch beim raschen Schütteln und Kühlen der Lösung verschwinden. In diesem Falle könnte die relativ kleine Menge von gebildetem Hitzeeiweiß durch die vorhandenen nicht neutralen Salze oder das übrige noch nicht denaturierte Eiweiß wieder gelöst oder bis zur Unkenntlichkeit der Trübung verteilt worden sein. Das wäre aber keine Rückbildung des erhitzten Eiweißes zum ursprünglichen Zustande. Für eine solche Auffassung dieser Erscheinung als eine scheinbare Reversibilität spricht auch der folgende Versuch.

Ein sorgfältig von den Salzen durch Dialyse befreites, wasserklar filtriertes Rinderserum wird zur Hälfte mit destilliertem Wasser verdünnt und in einer nach Art des Beckmannschen Apparates montierten Vorrichtung unter ständigem Rühren allmählich erwärmt. Im Momente des Auftretens einer eben erkennbaren zarten Opaleszenz (52° C) wird die Eiweißlösung in eine bereit gestellte, gekühlte Eprouvette umgeleert und unter Schütteln in strömendem kalten Wasser rasch auf 10° C abgekühlt. Es kommt auch bei noch so langer Fortsetzung der Abkühlung nicht wieder zur Klärung der Lösung, ja es kann selbst unter diesen Umständen die zarte Trübung etwas zunehmen.

Die Beobachtung von Corin und Ansiaux beruht allem Anscheine nach auf der Löslichkeit von kleinen Mengen koagulierten Eiweißes in den vorhandenen alkalischen Salzen. Sie kann jederzeit an dialysiertem, mit Salzen und wenig Alkali (oder Säure) versetztem Eiweiß reproduziert werden.

Die Hitzeveränderung von Eiweiß ist durch Abkühlung nicht mehr einer echten Rückbildung fähig.

Die Umstände, welche das Eintreten der Hitzegerinnung von nativen Eiweißlösungen bestimmen, sind gegenwärtig in der Hauptsache klar erkannt. Es sind dies die Reaktion und der Gehalt an neutralen Salzen. Je geringer der Salzgehalt, desto schwächer braucht die Alkaleszenz einer Eiweißlösung zu sein, um deren Hitzekoagulation zu verhindern. Durch unvollkommene Dialyse wird die Koagulierbarkeit einer Eiweißlösung aufgehoben (Aronstein[1]), Schmidt[2]), weil Spuren Alkali noch lange festgehalten werden, wenn die Neutralsalze bereits fast völlig herausdiffundiert sind. Schon äußerst kleine Mengen von Alkali oder Säure verhindern die Gerinnung von salzarmem Eiweiß (Heynsius[3]). Durch fortgesetzte Dialyse, welche auch das Alkali beseitigt, kehrt die Hitze-

[1]) Aronstein, Pflügers Archiv 8, 75.
[2]) Al. Schmidt, ebenda 11, 1.
[3]) Heynsius, ebenda 12, 549.

gerinnbarkeit von Eiweiß wieder (Winogradoff[1]), Haas[2]), Heynsius[3]). Da es jedoch nicht gelungen ist, ein absolut aschefreies Eiweiß zu gewinnen, so ist die Frage ungelöst, ob die letzten Spuren von Salzen für das Zustandekommen der Hitzegerinnung unerläßlich sind. Die Verdünnung von natürlichen Eiweißlösungen (für Serum auf das Zehnfache) beseitigt ihre Koagulierbarkeit durch Erwärmen. Es ist hier also nicht die absolute Menge der vorhandenen Salze, sondern deren Konzentration maßgebend.

Durch genügende Zugabe von Säure oder Lauge kann die Koagulierbarkeit von Eiweiß gänzlich aufgehoben werden. Es kommt dann beim Erwärmen zur Bildung von Acidalbumin oder Alkalialbuminat. Dieser Vorgang erfolgt auch bei niederer Temperatur nach genügend langer Einwirkung von Säure oder Lauge, er wird durch Erwärmen nur in hohem Maße beschleunigt (Johannson[4]) u. a.).

In jüngster Zeit gewann die Hitzekoagulation von Eiweiß dadurch ein besonderes Interesse für die Kolloidchemie, daß Hardy[5]) unter anderen Kolloiden ein durch Hitze ausgeflocktes Eiweiß wählte, um daran den Zusammenhang von Sinn und Größe der Ladung von Ionen mit deren Fällungsvermögen für Kolloide zu demonstrieren. Hardy löste durch Hitze koaguliertes Eiereiweiß in Säure oder Lauge, wodurch es im elektrischen Strome wie ein positives oder negatives Kolloid wanderte. Er fand für die Fällung von solchem elektropositiven Eiweiß die Anionen zugesetzter Salze, für die des negativen Eiweißes die Kationen maßgebend. Das Fällungsvermögen wuchs mit der Wertigkeit, also der Ladung der betreffenden Ionen.

So ansprechend auch diese allgemeine Übereinstimmung im Verhalten des koagulierten Eiweißes mit dem von Schulze[6]) und Hardy bei anorganischen Kolloiden gefundenen wirkt, so schien es nach unseren früheren Erfahrungen über die Sonderstellung der Eiweißkörper unter den Kolloiden nicht unwahrscheinlich, durch eine eingehendere Untersuchung der Hitzekoagulation neue Gesichtspunkte zu gewinnen. Diese Erwartung hat sich in der Tat erfüllt.

---

[1]) Winogradoff, Pflügers Archiv 9, 606.
[2]) Haas, ebenda 12, 378.
[3]) Heynsius, ebenda 12, 549.
[4]) Johannson, Zeitschr. f. physiolog. Chemie 9, 310.
[5]) Hardy, Proc. of the royal society 66, 110.
[6]) Schulze, Journal f. prakt. Chemie 25, 431.

2.

Das Zusammenwirken von Säure (oder Lauge) mit Neutralsalzen bei der Hitzekoagulation läßt sich in verschiedener Weise verfolgen. Ein solches Mittel bietet die Änderung der Koagulationstemperatur unter wechselnden Bedingungen. Für die Zwecke der vorliegenden Untersuchung wurde vielfach noch ein anderer Weg benutzt. Durch einen bestimmten Grad von Säuerung (oder Alkalisieren) kann die Hitzekoagulation vollständig gehemmt werden. Durch die Anwesenheit von Neutralsalzen wird diese Hemmung mehr oder minder aufgehoben. Es wurde nun für das zu untersuchende Salz und einen gewählten, nach Bedarf variierten Säuregrad an dem ersten Auftreten der Trübung die Grenzkonzentration des Salzes gemessen, bei welcher die gerinnungshemmende Säurewirkuug paralysiert wird. Nach der Größe dieser Konzentration konnte der Einfluß des Salzes auf die Hitzegerinnung beurteilt werden.

Es kamen ausschließlich Rindersera zur Anwendung, welche, wie dies in der letzten Mitteilung beschrieben, durch achtwöchentliche Dialyse [1]) salzarm gemacht und von der ausgefallenen Globulinfraktion klar abfiltriert waren. Der Stickstoffgehalt eines solchen Serums betrug 0,336 Proz., entsprechend ungefähr 2,1 Proz. Eiweiß. Jede Probe enthielt 5 ccm Serum, welches zu der bereit gehaltenen Mischung von Säure und Salzen zugefügt wurde. Das Gesamtvolum betrug stets 10 ccm.

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse einer Serie von Versuchen über die Wirkung der Kalisalze auf die Hitzekoagulation. Die koagulationsfördernde Wirkung wächst vom Kaliumchlorid zum Citrat bzw. Acetat. Der Säuregehalt aller Proben war 0,005 n-HCl. Zur vollen Unterdrückung der Hitzekoagulation genügte schon ein solcher von 0,003 bis 0,004 n-Salzsäure. Neben jedem Salze steht die niedrigste Konzentration in Bruchteilen einer Normallösung, bei welcher Trübung der gekochten Eiweißlösung eben erkennbar wird.

Betrachtet man die Reihenfolge der Anionen nach ihrer koagulationsfördernden Wirkung, so findet man eine gewisse Übereinstimmung mit der verkehrten Reihenfolge der Säuren nach ihrer Stärke. Das zeigt schon ein Vergleich mit den nebenstehenden Werten

[1]) Dieselben waren noch im Frühjahre 1905 von mir im chemischen Laboratorium des k. k. Rudolfspitales hergestellt worden. Ich bin Herrn Vorstand Dr. Ernst Freund für die freundliche Überlassung derselben zu besonderem Danke verpflichtet.

Tabelle I.

HCl 0,005 n, Leitfähigkeit HCl 1 mol. = 100 gesetzt.

Salz	Grenz-konzen-tration	Säure	Leitfähigkeit von	
			$1/_{10}$ mol. Lösung	$1/_{100}$ mol. Lösung
KCl	0,02	Salzsäure	118	123,8
KNO_3 . . .	0,01	Salpetersäure	116,7	122,5
KBr	0,01	Bromwasserstoffsäure	119,8	125,9
KSCN . . .	0,009—0,01	—	—	—
K_2SO_4 . . .	0,003—0,0035	Schwefelsäure	77,2	102,7
$K_2C_2O_4$ . .	0,003	Oxalsäure	38,7	53,0
$K_3C_6H_5O_7$.	0,002	Citronensäure	5,49	14,32
$KC_2H_3O_2$.	0,002	Essigsäure	1,557	4,96

ihrer elektrischen Leitfähigkeit. Das Salz der schwächst dissoziierten Essigsäure ist auch an koagulierendem Effekte allen Salzen mit ein- und zweiwertigen Anionen überlegen. Ein solcher Zusammenhang wäre leicht verständlich. Wird ein Salz mit dem Anion einer schwach dissoziierten Säure der mit der vollständig ionisierten Salzsäure versetzten Eiweißlösung zugefügt, so kommt es zu einem Absinken der Konzentration der freien Wasserstoffionen durch Bildung zahlreicher neutraler Moleküle der schwach dissoziierten Säure. Im Falle des essigsauren Salzes würde also durch dessen Zusatz ein Teil der freien H-Ionen zur Herstellung von elektrisch neutralen Molekülen CH_3COOH verbraucht. Herabsetzung des H-Ionengehaltes unter eine gewisse Schwelle (0,003 n-HCl) läßt aber die Koagulierbarkeit unserer Eiweißlösung sofort wiederkehren. Man könnte somit zunächst geneigt sein, in dieser Abnahme der Säuerung durch die zugesetzten Salze die ausreichende Ursache ihrer koagulationsfördernden Wirkung zu vermuten. Die nähere Betrachtung läßt jedoch das Bestehen einer besonderen direkten Salzwirkung auf die Hitzekoagulation erkennen.

Zunächst befördern Salze die Koagulation von Säureeiweiß, welche keine erhebliche Änderung im Gehalte an freien H-Ionen hervorrufen. Es sind dies Chlorid, Bromid und Nitrat, deren zugehörige Säuren fast gleich dissoziiert sind. Beim Chlorid, welches als gemeinionig mit der Salzsäure deren Dissoziation etwas herabdrückt, ist eher eine höhere Konzentration für das Eintreten der Trübung erforderlich als beim Bromid und Nitrat. Die Einwirkung auf den H-Ionengehalt ließe gerade das entgegengesetzte Verhalten erwarten. In der Salzgruppe der zweibasischen Säuren

findet sich kein nennenswerter Unterschied der Koagulationsbeförderung, wiewohl der Abfall der Dissoziation von der Schwefel- zur Oxalsäure bedeutender ist als von der Salpeter- zur Schwefelsäure. Zwischen den Salzen der letztgenannten Säuren besteht aber ein großer Abstand in der Einflußnahme auf die Hitzegerinnung. Ähnliches gilt von den Salzen der Essig- und Citronensäure, die beide fast in gleichem Ausmaße die Hitzekoagulation von Säureeiweiß begünstigen, während ihre Dissoziation recht verschieden ist.

Daß die Neutralsalze nicht auf dem Umwege der Änderung des H-Ionengehaltes bei der Hitzegerinnung wirken, ließ sich unmittelbar durch einen Versuch zeigen, bei welchem eine Verminderung der freien Wasserstoffionen durch den Salzzusatz ausgeschlossen wurde. Zu diesem Zwecke diente zum Ansäuern der Eiweißlösung Essigsäure anstatt der Salzsäure. In der Konzentration von 0,0125 n genügt Essigsäure, um die Koagulation der wie oben beschaffenen Eiweißlösung zu unterdrücken.

Wirkung der Essigsäure ohne Salze.

Säurekonzentration	0,005 n	0,01 n	0,0125 n
Verhalten beim Kochen	milchig opak	sehr zarte Trübung	klar

Zusätze der obigen Salze, mit Ausnahme von Acetat, konnten jetzt nur, wenn überhaupt, im Sinne einer Vermehrung der freien H-Ionen durch Umsetzung der Essigsäure in stärker dissoziierte Säuren wirken, also so weit eine Aciditätsänderung mitspielt, nur die Koagulation hemmen.

In Wirklichkeit zeigte eine Reihe von Versuchen, daß durch die Einführung der Essigsäure an Stelle der Salzsäure eine nennenswerte Abänderung der Ergebnisse nicht erzielt wird. Als Beleg dafür diene die folgende Tabelle.

Tabelle II.

Salze mit 0,0125 n Essigsäure	KCl	KBr	KNO_3	$KSCN$	K_2SO_4	$K_2C_2O_4$	$KC_2H_3O_2$	$K_3C_6H_5O_7$
Grenzkonzentration bei zarter Trübung	0,02 n	0,02 n	0,01 n	0,01 bis 0,009 n	0,001 n	0,001 n	0,001 n	0,001 bis 0,0008 n

Mit wachsendem Säuregehalt wächst die zur Hervorrufung der Hitzekoagulation nötige Konzentration an Neutralsalz anfangs unverhältnismäßig rasch. Einer Verdoppelung der Säuremenge von 0,005 auf 0,01 n-HCl entspricht beinahe eine Verzehnfachung der Salzkonzentration. Dabei ändert sich zunächst die Reihenfolge der Anionen nicht. Das zeigt sich in dem folgenden Versuchsbeispiel, welches die Beschaffenheit der Eiweißlösung nach dem Kochen illustriert.

Tabelle III.

Überall 0,01 n-HCl, 0,02 n-Salz.

KCl	KBr	KNO_3	KSCN	K_2SO_4	$K_2C_2O_4$	$KC_2H_3O_2$	$K_3C_6H_5O_7$
klar	klar	klar	klar	sehr zarte Trübung	milchig, etwas durchscheinend	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in klarer Flüssigkeit

Die Anionen ordnen sich in diesem Versuche ähnlich wie beim Säuregehalt 0,005 n-HCl (Tabelle I).

Über die Rolle einwertiger und zweiwertiger Kationen bei der Hitzegerinnung von Säureeiweiß geben die folgenden Versuche Aufschluß.

Tabelle IV.

Überall 0,005 n-HCl.

Konzentration	LiCl	NaCl	KCl	NH_4Cl	$MgCl_2$	$CaCl_2$
0,01 n	opaleszent	opaleszent	klar	klar	klar	klar
0,02 n	sehr zarte Trübung	opaleszent	zarte Opaleszenz	klar	fast klar	klar
0,03 n	zarte Trübung	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	opaleszent	zarteste Opaleszenz	zarteste Opaleszenz

Schon bei geringem Säuregrade sind Unterschiede im Verhalten der Kationen erkennbar. Die Beförderung der Hitzekoagulation fällt in der Reihe Li, Na, K, NH_4. Mg und Ca stehen dem NH_4 nahe.

Bei höherem Säuregehalte 0,01 n-HCl und entsprechend höherem Salzgehalte ist dieselbe Wirkungsreihe der Kationen nach-

weisbar, wie das folgende Beispiel zeigt. Auch hier steht das Lithiumchlorid an der Spitze.

Tabelle V.

Überall 0,01 n-HCl.

Konzentration	LiCl	NaCl	KCl	NH_4Cl
0,1 n	opaleszent	klar	klar	klar
0,2 n	grobflockig in trüber Flüssigkeit	opaleszent	opaleszent	fast klar
0,25 n	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit	milchig opak	milchig durchscheinend	zarte Trübung
0,3 n	grobflockig in klarer Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	milchig opak
0,4 n	grobflockig in klarer Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit

Bei dem Säuregehalte 0,01 n-HCl erzeugt Lithiumchlorid von 0,2 n-Konzentration schon in der Zimmertemperatur eine zarte Trübung, die mit zunehmendem Salzgehalte wächst.

Näheres über das Verhältnis von ein- und zweiwertigen Kationen bei der Beförderung der Hitzegerinnung von Säureeiweiß enthalten die folgenden Versuchstabellen.

Tabelle VI.

0,004 n-HCl, welche für sich die Hitzekoagulation noch völlig hemmt.

Konzentration	KNO_3	$Mg(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$	$Sr(NO_3)_2$	$Ba(NO_3)_2$
0,01 n	fast klar	klar	klar	klar	klar
0,02 n	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	opaleszent	opaleszent	opaleszent
0,03 n	milchig durchscheinend	milchig, fast opak	milchig durchscheinend	milchig, fast opak	milchig, schwach durchscheinend
0,04 n	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	milchig, fast opak	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit

Bei dem Säuregrade 0,004 n-HCl bestehen somit nur geringe Unterschiede zwischen den Nitraten des einwertigen Kaliums und der zweiwertigen Kationen Mg, Ca, Sr, Ba hinsichtlich der Beförderung der Hitzekoagulation. Die Nitrate der alkalischen Erden wirken etwas schwächer als die des K und Mg.

Auch bei dem Säuregehalte 0,01 n-HCl ändern sich diese Verhältnisse nicht. In der folgenden Tabelle ist das Verhalten der Salzeiweißmischungen unter I bei Zimmertemperatur und unter II nach dem Erhitzen registriert, da in einem Teile der Eiweißsalzkombinationen bereits in der Kälte Niederschläge auftreten.

Tabelle VII.

Überall 0,01 n-HCl.

Konzentration		KNO_3	$Mg(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$
0,2 n . . .	I.	opaleszent	opaleszent	opaleszent
	II.	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit
0,25 n . . .	I.	sehr zarte Trübung	zarte Trübung	zarte Trübung
	II.	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit
0,3 n . . .	I.	dichtere Trübung	dichtere Trübung	milchig durchscheinend
	II.	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit

Analoges lehrt die folgende Tabelle über die Rolle der Kationen bei der Hitzegerinnung von Säureeiweiß.

Tabelle VIII.

Überall 0,01 n-HCl.

Konzentration	KCl	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$SrCl_2$	$BaCl_2$
0,1 n	klar	klar	klar	klar	klar
0,2 n	milchig durchschein.	opaleszent	opaleszent	zarte Opaleszenz	zarte Opaleszenz
0,3 n	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	milchig mit gallertigen Flocken	milchig, fast opak	milchig gallertige Flocken	milchig opak feine Flocken

Auch bei den Chloriden, welche in den angeführten Konzentrationen bei Zimmertemperatur keine Trübungen erzeugen, zeigt sich nur ein geringer Unterschied im Einflusse von ein- und zweiwertigen Kationen. Die Chloride der Erdalkalien und des Magnesiums wirken etwas schwächer hitzekoagulierend auf das Säureeiweiß als das Kaliumchlorid.

Die bisherigen Versuchsergebnisse lauten kurz zusammengefaßt: „Bei der Hitzekoagulation von Säureeiweiß ist die Wirkung zugesetzter Salze zum weitaus überwiegenden Teil von den Anionen derselben bestimmt. Diese koagulierende Salzwirkung ist eine direkte und beruht nicht auf einer Änderung des Wasserstoffionengehaltes. Ordnet man für geringe und mittlere Säure- und Salzkonzentrationen die Anionen steigend nach ihrer Beförderung der Hitzegerinnung, so resultiert die Reihe Chlorid, Bromid, Nitrat, Rhodanid, Sulfat, Oxalat, Acetat, Citrat. Für diese Reihenfolge ist die Ladung der Anionen insofern nicht ausschlaggebend, als zwischen zwei- und dreiwertigen kein nennenswerter Unterschied besteht und das einwertige Acetation in unverhältnismäßiger Weise von den übrigen einfach geladenen Anionen absteht. Der geringfügige Einfluß der Kationen auf die Hitzegerinnung von Säureeiweiß dokumentiert sich in einem eben merkbaren Abfall der Koagulationsbeförderung in der Reihe Li, Na, K, NH_4. — Die zweiwertigen Mg, Ca, Ba, Sr stehen dem NH_4 in ihrer Wirksamkeit sehr nahe.“

Diese Resultate ließen trotz der deutlich durchschimmernden Beziehungen zwischen dem Verhalten von erhitztem Säureeiweiß und elektropositiven anorganischen Kolloiden zugleich so viele Unterschiede im Einzelnen erkennen, daß eine weitere Untersuchung dieser Verhältnisse geboten war.

3.

Es bestehen unzweifelhaft gewisse Ähnlichkeiten im Verhalten von angesäuerten Lösungen von nativem Eiweiß (I) mit dem des erhitzten Säureeiweißes (II) und mit dem von koaguliertem Alkalialbuminat, das nachträglich sauer (III) gemacht wurde. Diese drei Arten von Eiweiß wandern im elektrischen Felde zur Kathode. In allen drei Fällen kehrt sich die elektrische Konvektion in alkalische Medien um, was mit der amphoteren Elektrolytnatur der Eiweißkörper zusammenhängt, die sie mit den einfachsten Aminosäuren teilen.

Die elektrische Ladung von Kolloiden wurde zuerst von

Billitzer[1]) mit einer elektrolytischen Dissoziation derselben in Zusammenhang gebracht und es kann, nach den Ergebnissen unserer früheren Untersuchungen, kaum bezweifelt werden, daß sich die Verhältnisse bei den Eiweißkörpern am besten mit dieser Auffassung in Einklang bringen lassen. Sorgfältig von Elektrolyten befreites Eiweiß läßt keine erhebliche elektrische Wanderung erkennen, es ist elektrisch neutral. In diesem Falle kann keine merkliche Differenz in der Zahl der von ihm pro Zeiteinheit in die Lösung entsendeten positiven Wasserstoff- und negativen Hydroxylionen bestehen. In bezug auf die Erklärung der Vorgänge beim Ansäuern (oder Alkalisieren) von Eiweiß besteht ein Unterschied der Meinungen. Hardy[2]) befürwortet, anläßlich seiner physikalisch-chemischen Studien des Globulins, in Anlehnung an ältere Untersuchungen von Sjöqvist[3]), die Bildung einer Art von Salzen der Eiweißkörper mit den Säuren (oder Laugen) ohne Wasseraustritt. Nach dieser Annahme würde das Eiweiß in einer Lösung von Salzsäure HCl addieren und dabei unter Aussendung von negativen Chlorionen elektropositive, kolloidale Eiweißionen bilden. J. Loeb[4]) leitet dagegen die positive Ladung von angesäuertem Eiweiß in folgender Weise aus dessen amphoterem Charakter ab. Neutrales Eiweiß dissoziiert annähernd gleich viel positive H- und negative OH-Ionen. Durch Zusatz von Säure wird die Dissoziation der H-Ionen des Eiweißes zurückgedrängt, es sendet nun relativ mehr negative OH-Ionen aus und wird selbst elektropositiv. Der Unterschied der Auffassungen von Hardy und Loeb besteht also darin, daß der erstere eine Dissoziation der betreffenden Säureanionen, der letztere eine Abspaltung der negativen Hydroxylionen als Ursache der positiven Eiweißladung betrachtet. In beiden Fällen wären auch die kolloidalen Eiweißionen dementsprechend verschieden zusammengesetzt. Auch wir[5])

[1]) Billitzer, Zeitschr. f. physik. Chemie 51, 130.
[2]) Hardy, The journal of physiology 33, 251.
[3]) Sjöqvist, Skandinav. Arch. 5, 277; 6, 255.
[4]) J. Loeb, University of California Publications, Physiology 1, 149.
[5]) Naturw. Rundsch. 21 (1906), Nr. 1 u. 2. Dort ist nur mit Rücksicht auf den Zusammenhang der Darstellung die zeitliche und dynamische Auffassung des Ladungsvorganges in den Vordergrund gerückt. Die Ausführungen von Arrhenius (Immunochemie, Leipzig 1907, S. 105 u. 106) könnten wohl das Mißverständnis zulassen, als ob die amphotere Elektrolytnatur den kolloidalen Charakter der Eiweißkörper ausschließen würde. Es scheint aber im Gegenteil nicht nur den Eiweißstoffen, sondern fast allen bekannten Kolloiden ein amphoteres Verhalten zuzukommen, und bei den Eiweißkörpern ist ein solches ebenso bei den gröbsten Suspensionen wie bei klaren Lösungen und allen dazwischen gelegenen Übergängen nachzuweisen.

haben eine im wesentlichen mit Hardys Anschauung übereinstimmende Vorstellung von dem Ursprunge der Eiweißladung entwickelt. In den erwähnten drei Fällen von elektropositivem Eiweiß wäre für die Entstehung des elektrischen Zustandes ein gleichartiger Vorgang vorauszusetzen.

Die drei Arten von elektropositivem Eiweiß zeigen ferner einen gemeinschaftlichen Zug darin, daß ihre Zustandsänderungen in erster Linie von den Anionen zugesetzter Elektrolyte bestimmt sind. Unter diesen Umständen gewinnt die Frage Bedeutung, ob nicht noch engere Beziehungen zwischen diesen Eiweißarten bestehen. Der von Hardy[1]) untersuchte Fall, das durch Säure elektropositiv gemachte Albuminat (III), kann hier von vornherein ausgeschieden werden, denn die Koagulation von Alkalieiweiß geht mit tiefergreifenden, irreversiblen chemischen Veränderungen einher. Hier wird ein in charakteristischer Weise denaturiertes Eiweiß nachträglich elektropositiv gemacht. Anders liegen die Dinge bei den Zustandsänderungen von Säureeiweiß bei niederer (I) und höherer (II) Temperatur. Wir wissen, daß Säure auch bei niederer Temperatur das Eiweiß in genügend langer Zeit ebenso verändert, wie bei höheren Wärmegraden. Es besteht dabei nur ein Unterschied in der Geschwindigkeit der Reaktion. Wäre es da nicht möglich, daß Zusatz entsprechend konzentrierter Elektrolyte zu Säureeiweiß dieselbe Zustandsänderung in der Kälte hervorruft, zu deren Zustandekommen bei niederen Elektrolytkonzentrationen es nur einer erhöhten Temperatur bedarf? Man müßte dann annehmen, daß die Elektrolyte in der Kälte zwei Prozesse bedingen: die Denaturierung von Säureeiweiß und seine Ausflockung. Die folgenden Betrachtungen sind der Entscheidung dieser in vieler Hinsicht wichtigen Frage gewidmet.

Eiweiß wird in saurer Lösung durch gewisse Neutralsalze der Alkalimetalle bei Zimmertemperatur gefällt (Posternak[2]). Dieser Fällungsvorgang wurde schon bei einer früheren[3]) Gelegenheit eingehender untersucht. Die Fällung ist, im Gegensatze zu den anderen Neutralsalzfällungen, durch Verdünnung des Salzes nicht reversibel. Das Eiweiß gleicht darin dem beim Erhitzen (in Anwesenheit von Salzen) koagulierten Säureeiweiß. Auch sonst zeigt sich ein weitgehender Parallelismus in beiden Fällen. Das Lithiumchlorid, welches den anderen Alkalichloriden bei der Beförderung der

[1]) Hardy, Proc. of the royal soc. 66, 110.
[2]) Posternak, Annales de l'Institut Pasteur 15, 85.
[3]) Pauli, Diese Beiträge 5, 27.

Hitzekoagulation merklich überlegen ist, übertrifft dieselben auch in der Fällung von Säureeiweiß in der Kälte (Tabelle IV, V). Desgleichen findet sich bei den Nitraten (Tabelle VII) ein Handinhandgehen von Kältefällung und Hitzegerinnung des Säureeiweißes. Das Anion, welches saures Eiweiß bei niederen Temperaturen am mächtigsten ausflockt, ist das SCN. Die folgende Zusammenstellung belehrt über seine Fällungswirkung auf Säureeiweiß bei hoher und niederer Temperatur.

Tabelle IX.

Überall 0,01 n-HCl.

Konzentration von KSCN	Verhalten bei Zimmertemperatur			Verhalten nach dem Kochen		
	sofort	n. 24 Std.	nach 48 Std.	sofort	nach 24 Std.	nach 48 Std.
0,01 n	klar	klar	klar	klar	klar	klar
0,03 n	klar	klar	klar	klar	opaleszent	opaleszent
0,05 n	klar	klar	fast klar	fast klar	milchig durchschein.	milchig durchschein.
0,07 n	klar	opaleszent	starke Opaleszenz	zarte Trübung	milchig fast opak	opake Gallerte
0,08 n	klar	zarte Trübung	milchig sehr durchscheinend	milchig sehr durchscheinend	opake Gallerte	opake Gallerte, darüber etwas klare Flüssigkeit
0,09 n	opaleszent	milchig, sehr durchscheinend	milchig durchscheinend	milchig durchscheinend und gallertige Flocken	gallertige Flocken in milchiger Flüssigkeit	opake flockige Gallerte neben klarer Flüssigkeit
0,1 n	sehr zarte Trübung	feinflock. i. schwach trüber Flüssigkeit	feinflockig abgesetzt in trüber Flüssigkeit	gallertige Flocken in trüber Flüssigkeit	grobflockig abgesetzt in klarer Flüssigkeit	grobflockig abgesetzt

Nach diesen Versuchen könnte der Unterschied in der Wirkung von Rhodanid auf Säureeiweiß bei hoher und niederer Temperatur sehr wohl als ein gradueller erscheinen. Dafür würde das Zusammenfallen der koagulierenden Grenzkonzentration nach 48 Stunden bei Zimmertemperatur mit der unmittelbar nach dem Kochen gefundenen sprechen.

Eine auffällige Verschiedenheit der Fällung von Säureeiweiß bei hoher und niederer Temperatur scheint aber vorzuliegen, wenn

man für beide Vorgänge die Anionen nach ihrem Wirkungsgrade ordnet. In der Kälte nimmt die Niederschlagsbildung in saurer Eiweißlösung nach der Reihe $C_2H_3O_2$, SO_4, Cl, Br, NO_3, SCN zu. Für die Hitzekoagulation lautet die Reihe (für 0,01 n-HCl und 0,02 n-Salz) gleichfalls nach steigendem Wirkungsgrad Nitrat, Chlorid, Bromid, Rhodanid, Sulfat, Oxalat, Acetat, Citrat. Diese Reihe ist zum Teil geradezu der ersten entgegengesetzt. Die bei der Hitzegerinnung mächtig wirkenden Acetat- oder Citrationen wirken bei Zimmertemperatur erst bei hohem Salz- und Säuregehalt, während umgekehrt das bei niederer Temperatur so mächtig fällende Rhodanion oder das ihm nahestehende Brom- und Nitration die Hitzekoagulation von Säureeiweiß nur in relativ geringem Grade fördern.

Es läßt sich nun zeigen, daß die Verschiedenheit der Anionenreihe bei der Ausflockung von Säureeiweiß in der Kälte und Hitze durch Änderung der Versuchsbedingungen zum Verschwinden gebracht werden kann. Die obige Anionenordnung, nach welcher die Hitzekoagulation von Säureeiweiß erfolgt, ist für relativ niedrige Werte der Salzkonzentration gewonnen, da sie aus der Bestimmung des geringsten, zur eben sichtbaren Koagulation führenden Salzgehaltes abgeleitet wurde. Hingegen sind zur Fällung von Säureeiweiß in der Kälte meist höhere Salzkonzentrationen erforderlich. Es war daher zu prüfen, ob nicht auch für die Hitzekoagulation bei wachsendem Salzgehalte eine Verschiebung der Anionenreihe und schließlich ein Übergang in die bei der Fällung von Säureeiweiß in der Kälte maßgebende Ordnung stattfindet. Schon der erste orientierende Versuch fiel zugunsten dieser Auffassung aus. Es wurde bei hoher und bei niederer Salz- und Säurekonzentration der Koagulationspunkt nach Zugabe zweier Salze festgestellt, von denen das eine, Kaliumbromid, in der Kälte Säureeiweiß leicht niederschlägt, die Hitzekoagulation desselben hingegen verhältnismäßig wenig befördert, während das zweite, Kaliumcitrat, sich in beiden Beziehungen umgekehrt verhält. Die Bestimmungen des Koagulationspunktes geschahen nach einer früher[1]) angegebenen Methode durch Beobachtung der Trübung, bei welcher eine hinter der Probe gehaltene bestimmte Druckschrift eben verschwindet. Außer diesem recht scharf zu bestimmenden Moment, wurde auch der weniger scharf reproduzierbare Punkt eben beginnender Opaleszenz in der Lösung fixiert.

---

[1]) Pauli, Pflügers Archiv 78, 315.

Sämtliche Proben waren, wie immer, auf 10 ccm Gesamtvolumen gebracht und enthielten 5 ccm dialysiertes Rinderserum.

Tabelle X.

Probe	Reines Serum °C	0,0125 n-Essigsäure		0,025 n-Essigsäure	
		0,03 n-KBr °C	0,03 n-K citr. °C	0,3 n-KBr °C	0,3 n-K citr. °C
erste Trübung	48,2—48,5	74—76	51—52	44—45	63,4
opak	52,8—53	96,2	59,3	51	68,8—69

Diese Versuche zeigen, daß in der Tat bei wachsendem Salz- und Säuregehalt sich das Verhältnis der beiden Salze zur Hitzekoagulation umkehrt. Dann wirkt das Bromid stärker koagulationsfördernd, während das Citrat erst bei einem höheren Wärmegrade zur Eiweißkoagulation führt. Das Wirkungsverhältnis der beiden Anionen ist nun das gleiche geworden wie bei der Fällung von Säureeiweiß in der Kälte, das Bromid ist dem Citrate überlegen.

Daß auch die übrigen Anionen, abhängig vom Salzgehalte, die Reihenfolge ihrer Wirksamkeit bei der Hitzekoagulation ändern, zeigt die folgende Tabelle der Koagulationspunkte. Noch leichter orientiert die graphische Darstellung der Versuchsergebnisse in Fig. 1.

Tabelle XI.

Überall 0,005 n-HCl. I entspricht der ersten Trübung, II der völligen Undurchsichtigkeit.

KCl	0,05 n	0,1 n	0,2 n	0,3 n	0,45 n
I	61,8°	56,8°	50°	48,8°	?
II	81,4	65,7	60,4	60,4	60,4

KNO_3	0,02 n	0,05 n	0,1 n	0,3 n	0,45 n
I	57,5°	58,5°	52,5°	opaleszent	sehr zarte Trübung
II	bei 95° nicht opak	68,4	61,4	56,2	55,6

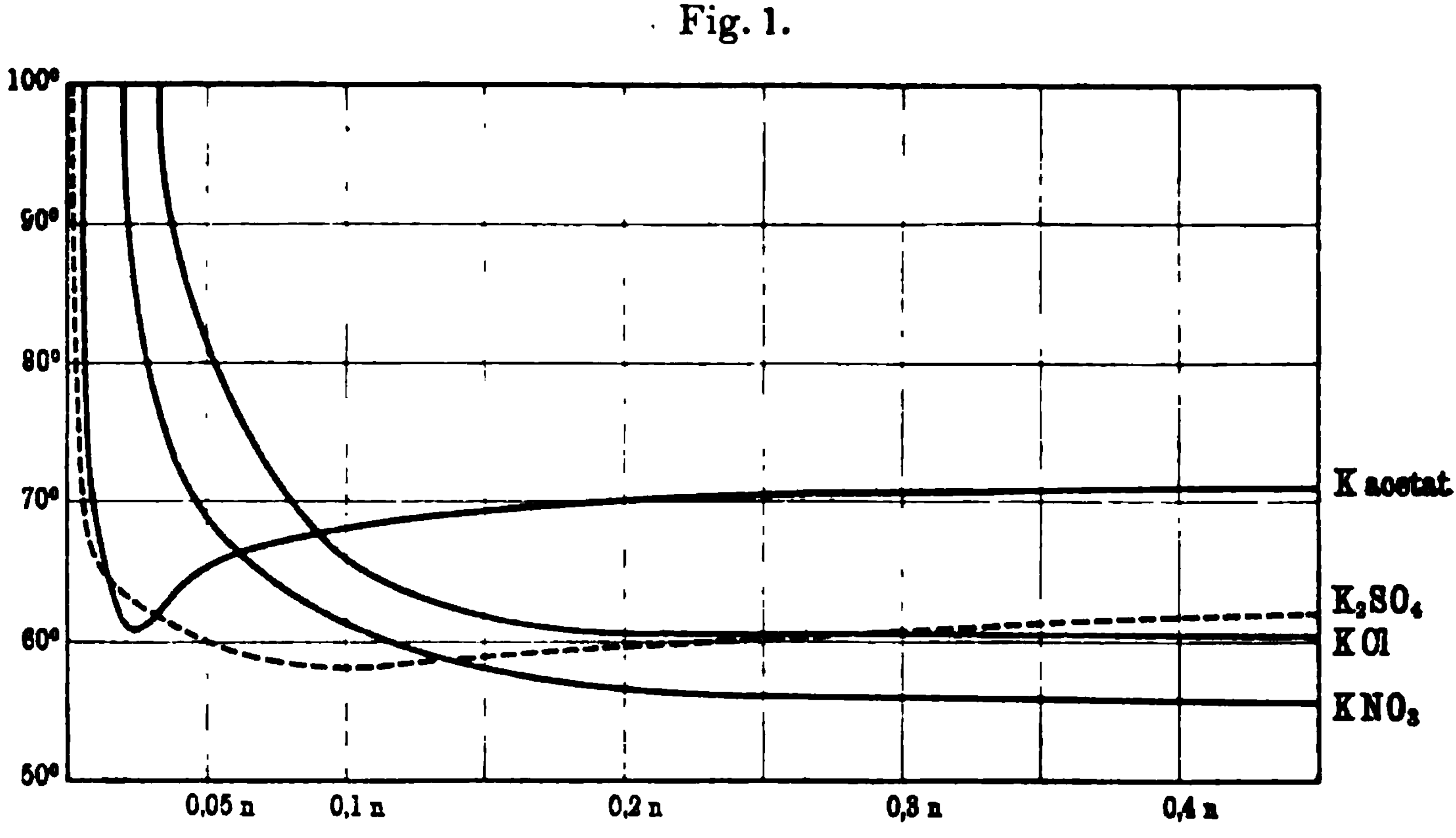
Kacet.	0,002 n	0,005 n	0,01 n	0,02 n	0,05 n	0,1 n	0,2 n	0,4 n
I	68°	62—64°	59°	56°	60,1°	60°	65°	68,5°
II	nicht bei 97°	72,8	69	60,8—61,2	66,6	68,2	70,1	71

K_2SO_4	0,002 n	0,005 n	0,01 n	0,02 n	0,05 n	0,1 n	0,2 n	0,4 n
I	70°	64,5°	59°	56°	50—51°	50—51°	48—50°	45,2—46°
II	opalesz. bei 97°	74,8	67,5	63	60,2	58,8	59,8	61,7

In Fig. 1 sind die Koagulationspunkte II der Tabelle XI als Ordinate eingetragen. Als Abszisse dient die Konzentration.

Man ersieht aus diesen Versuchen, daß schon bei niederem und konstantem Säuregrade mit wachsendem Salzgehalt eine Überkreuzung der Kurven stattfindet, so daß sich schließlich die Reihenfolge der Anionen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Hitzekoagulation umkehrt. Sie lautet bei 0,4 n-Salzkonzentration ansteigend

Fig. 1.



nach dem Maße der Koagulationsbeförderung (entsprechend dem Herabdrücken des Koagulationspunktes): Acetat, Sulfat, Chlorid, Nitrat, was vollständig mit der Ordnung der Anionen bei der Fällung von Säureeiweiß bei niederen Temperaturen übereinstimmt.

In der folgenden Tabelle, welche für höheren Salz- und Säuregehalt die Koagulationspunkte wiedergibt, zeigt sich ein direkter Übergang von den Säureeiweißfällungen bei hoher zu denen bei niederer Temperatur.

Tabelle XII.

Überall 0,02 n-HCl, sonst wie Tabelle XI.

KCl	0,2 n	0,3 n	0,4 n	0,6 n	0,9 n
I	75°	54°	36,5°	35—36°	20°
II	opaleszent bei 98°		49,6	46,2	25

KNO_3	0,1 n	0,15 n	0,2 n	0,25 n	0,3 n	0,35 n
I	46,8°	54—50°.	44,4°	36° ?	29°	14°
II	nicht opak bei 96°		67,5	44,6	41,2	36

K acet.	0,03 n	0,05 n	0,1 n	0,2 n	0,4 n	0,6 n	0,9 n	1,2 n	1,6 n
I	69°	57,5°	59°	60,8°	63°	63°	65,3°	68,2°	65,5°
II	nicht opak bei 98°	69	65,9	66,4	69,8	70,2	71	71,5–72	70,8

K_2SO_4	0,03 n	0,05 n	0,1 n	0,2 n	0,3 n	0,4 n
I	96°	48—50°	41° ?	34,8°	28°	20—22°
II	nicht opak bei 96°		51,4	41,8—42,1	38,4	32,8

Dieser Tabelle XII entspricht die Fig. 2.

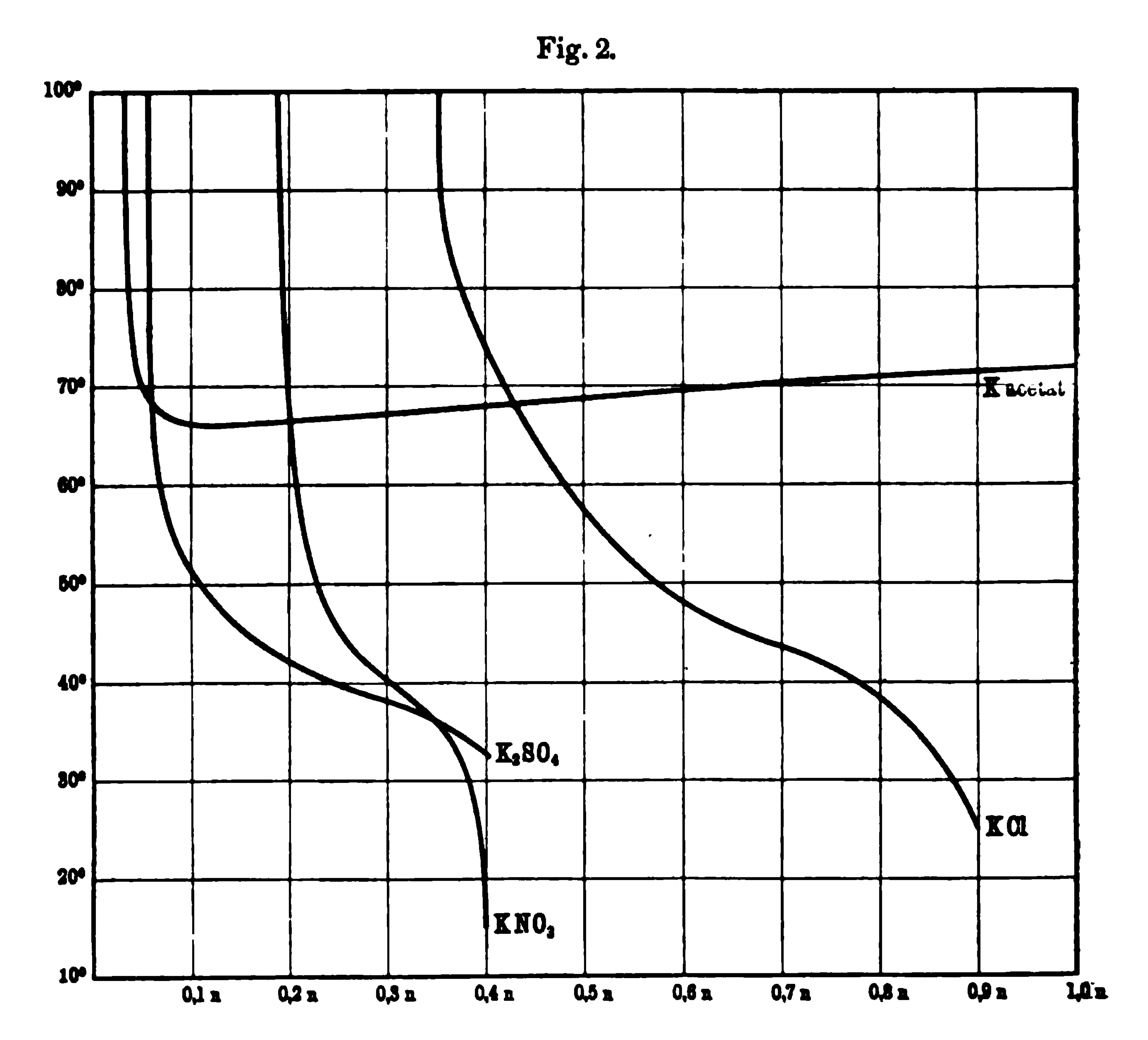
Auch bei hohem Säuregrade findet mit steigendem Salzgehalte eine Umkehr der Reihenfolge der Anionen statt, wie aus den Überkreuzungen der Kurven in dem zugehörigen Diagramm unmittelbar ersichtlich ist. Bei Erhöhung des Salzgehaltes fallen die Kurven, mit Ausnahme des Acetates, schließlich in den Bereich der Zimmertemperatur.

Aus der graphischen Darstellung der Koagulationspunkte lassen sich ohne weiteres noch folgende Tatsachen ablesen. Da sich die Kurven, welche den Einfluß von Chlorid und Nitrat auf die Hitzekoagulation von Säureeiweiß wiedergeben, in keinem Punkte schneiden, so entsprechen bei diesen Salzen gleichen Konzentrationen stets verschiedene Koagulationspunkte. Hingegen gilt von allen anderen möglichen Salzpaaren von Chlorid, Nitrat, Acetat und Sulfat, deren zugehörige Kurven sich schneiden, daß sich bei denselben stets Punkte gleicher Konzentration finden, welchen gleiche Koagulationstemperaturen zukommen. Es findet sich bei diesen Salzpaaren je eine Konzentration, bei der sich diese Elektrolyte in ihrem Einflusse auf die Hitzekoagulation gegenseitig vertreten können. Die Acetatkurve wird als die einzige von einer anderen, der des Sulfates, in zwei Punkten geschnitten (Fig. 1). Dies hängt mit der eigentümlichen Form der Acetatkurve zusammen, welche bei 0,02 n-Salzgehalt ein Maximum der Koagulationsbegünstigung zeigt, dem erst ein jäher, dann allmählicher Anstieg des Koagulationspunktes mit zunehmender Salzkonzentration folgt.

Diese Deformation der Acetatkurve im Sinne einer Zone unverhältnismäßiger Verstärkung der Hitzekoagulation könnte mit der durch das Acetat bedingten H-Ionenverminderung zusammenhängen. Es würde sich da der direkten Salzwirkung auf die Hitzekoagulation eine zweite durch Abstumpfung der Acidität superponieren.

Eine weitere Übereinstimmung von Säureeiweißfällung durch Elektrolyte in der Hitze und Kälte ergibt sich aus einer weiteren

Fig. 2.



Beobachtung, auf deren sonstige Bedeutung noch später verwiesen werden soll. Sie läßt sich in dem folgenden Satze aussprechen: „Sowohl für die Hitzekoagulation, als auch für die Fällung von Säureeiweiß bei niederer Temperatur, bleibt bei konstantem Salzgehalt eine Vermehrung des Säuregrades über eine gewisse Grenze hinaus ohne wesentlichen Einfluß."

Aus den zahlreichen zur Erhärtung dieses Satzes angestellten Versuchen sei der folgende für die Hitzekoagulation angeführt.

Tabelle XIII.

KCl	0,005 n-HCl	0,01 n-HCl	0,015 n-HCl	0,02 n-HCl	0,025 n-HCl
0,2 n	grobflockig in trüber Flüssigkeit	zarte Trübung	opaleszent	opaleszent	opaleszent
0,3 n	grobflockig in trüber Flüssigkeit	gallert. flock. in trüber Flüssigkeit	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung	sehr zarte Trübung
0,4 n	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	milchig durch-scheinend	milchig sehr durch-scheinend	milchig sehr durch-scheinend
0,6 n	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit	grobflockig in klarer Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit	grobflockig in trüber Flüssigkeit

Es zeigt sich in diesem Versuche, daß zunächst das Wachsen der Salzsäurekonzentration von 0,005 n bis 0,015 n für den gleichen Salzgehalt eine zunehmende Hemmung der Hitzegerinnung bewirkt; darüber hinaus ändert eine Erhöhung des Säuregrades nichts mehr an dem Versuchsergebnisse.

Ähnliches ergibt sich aus dem folgenden Versuche (Tab. XIV, S. 72) für die Hitzekoagulation und Fällung von Säureeiweiß bei Zimmertemperatur durch Kalinitrat.

Hier sei nur noch die folgende Versuchsserie (Tabelle XV) mitgeteilt, welche für Kaliumsulfat die Fällungsgrenzen des Säureeiweißes bei Zimmertemperatur wiedergibt. Auch hier ist das Ergebnis vom Säuregrade 0,02 n an konstant.

Tabelle XV.

K_2SO_4	0,005 n-HCl		0,01 n-HCl		0,02 n-HCl		0,025 n-HCl	
	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.
0,2 n	klar	fast klar	klar	opalesz.	klar	opalesz.	klar	opalesz.
0,3 n	klar	fast klar	klar	opalesz., wenig Niederschlag abgesetzt	klar	stärker opalesz.	klar	stärker opalesz.
0,4 n	klar	zarteste Opaleszenz	klar	opalesz., wenig Niederschlag abgesetzt	klar	zarte Trübung	klar	zarte Trübung

Tabelle XIV.

KNO_3	0,005 n-HCl		0,01 n-HCl		0,02 n-HCl		0,025 n-HCl	
	Kälte	Hitze	Kälte	Hitze	Kälte	Hitze	Kälte	Hitze
0,2 n sofort	klar	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	klar	grobflockig, fast klare Flüssigkeit	klar	opaleszent	klar	opaleszent
0,2 n nach 24 Std.	opaleszent	grobflockig in klarer Flüssigkeit	opaleszent, neben wenig Niederschlag	grobflockig in klarer Flüssigkeit	sehr zarte Trübung	milchig sehr durchscheinend	sehr zarte Trübung	milchig sehr durchscheinend
0,3 n sofort	klar	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	zarte Trübung	grobflockig, fast klare Flüssigkeit	fast klar	milchig durchscheinend	fast klar	zarte Trübung
0,3 n nach 24 Std.	opaleszent	grobflockig in klarer Flüssigkeit	opaleszent, wenig Niederschlag	grobflockig in klarer Flüssigkeit	milchig opak	grobe Flocken in gallertiger trüber Flüssigkeit	milchig opak	grobflockig in gallertiger trüber Flüssigkeit
0,4 n sofort	klar	grobflockig in schwach trüber Flüssigkeit	milchig durchscheinend	grobflockig in fast klarer Flüssigkeit	milchig durchscheinend	milchig durchscheinend	milchig durchscheinend	milchig durchscheinend
0,4 n nach 24 Std.	opaleszent	grobflockig in klarer Flüssigkeit	fast klar, Niederschlag abgesetzt	grobflockig in klarer Flüssigkeit	grobflockig abgesetzt von klarer Flüssigkeit	grobe Flocken in gallertiger trüber Flüssigkeit	grobflockig abgesetzt von trüber Flüssigkeit	gallertig und grobflockig abgesetzt von klarer Flüssigkeit

Aber auch der umgekehrte Satz, daß bei einer konstanten Säurekonzentration eine Vermehrung des Salzgehaltes über eine gewisse Grenze keinen erheblichen Einfluß auf die Koagulation nimmt, hat Geltung und zwar sicher für die Hitzegerinnung bei niederen Säuregraden.

Man ersieht dieses Verhalten am besten unmittelbar aus der graphischen Darstellung der Koagulationsverhältnisse bei 0,005 n-HCl in Fig. 1. Von einem Salzgehalte an, der ungefähr bei 0,2 n liegt, verlaufen sämtliche Kurven annähernd horizontal weiter.

Auch bei der Säureeiweißfällung in der Kälte scheint für konstanten Säure- und variierenden Salzgehalt über eine bestimmte Höhe des letzteren eine ähnliche Gesetzmäßigkeit zu bestehen (vgl. auch Tab. XVI), doch sind die Fällungen in den betreffenden Versuchen noch nicht quantitativ bestimmt worden.

Noch eine Gemeinschaft der Fällung von Säureeiweiß durch Elektrolyte bei niederer Temperatur mit dessen Hitzekoagulation bedarf der Feststellung. Für die letztere hatte sich zeigen lassen, daß es sich in erster Reihe um eine direkte Salzwirkung handelt und nicht um eine indirekte, durch Herabsetzung der Wasserstoffionenzahl bedingte Koagulierbarkeit des Säureeiweißes. Dasselbe läßt sich auf dem gleichen Wege für die Eiweißfällung in der Kälte dartun. Verwendet man an Stelle der stark ionisierten Salzsäure

Tabelle XVI.

Überall 0,025 n-Essigsäure, Temperatur 15° C.

Salz	Konzentration 0,2 n		Konzentration 0,4 n	
	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.
KSCN	milchig durchscheinend	flockig dichter Niederschlag in trüber Flüssigkeit	milchig durchscheinend	flockiger, dichter Niederschlag in trüber Flüssigkeit
KNO_3	zarte Opaleszenz	feinflockig abgesetzt in zarttrüber Flüssigkeit	sehr zarte Trübung	feinflockig abgesetzt in zarttrüber Flüssigkeit
KBr	klar	opaleszent	klar	feinflockig abgesetzt in zarttrüber Flüssigkeit
KCl	klar	opaleszent	klar	opaleszent
K oxal.	opaleszent	stärker opaleszent	opaleszent	stärker opaleszent
K_2SO_4	klar	opaleszent	klar	opaleszent
K acet.	klar	klar	klar	klar
K citr.	klar	klar	klar	klar

die schwach dissoziierte Essigsäure zur Herstellung des Säureeiweißes, so bleibt die Ordnung der Anionen nach ihrer Wirkung davon unbeeinflußt.

Es kann also auch hier eine Änderung der Zahl der freien H-Ionen nicht das Wesen der koagulierenden Salzwirkung ausmachen. Als Beleg dafür diene die obige Versuchsreihe (Tab. XVI), aus welcher die bekannte Anionenfolge ersichtlich ist.

Fassen wir nun zum Schlusse noch einmal alle Merkmale zusammen, in welchen sich eine Gemeinschaft des Verhaltens von Säureeiweiß bei niederer und hoher Temperatur ausprägt, so sind diese:

1. die Wanderung zur Kathode und deren Umkehr in alkalischen Medien;
2. das mächtige Überwiegen der Anionenwirkung bei der Ausflockung;
3. die Irreversibilität des Gefällten bei Verdünnung;
4. die Identität der Reihenfolge der Anionen nach ihrer Wirksamkeit bei entsprechendem Salzgehalte;
5. das Bestehen einer direkten Salzwirkung;
6. der stetige Übergang der Koagulationskurven von der Koagulation bei hoher bis zu der bei Zimmertemperatur.

4.

Es ist somit eine stattliche Zahl von gemeinsamen Merkmalen und Beziehungen, in welchen sich die Verwandtschaft von Säureeiweißkoagulation bei hoher und niederer Temperatur offenbart. Dürfen wir in der Tat diese beiden Arten von Zustandsänderungen des Eiweißes als qualitativ gleich und nur durch die Reaktionsgeschwindigkeit unterschieden betrachten?

Erfahrungen, die bei anderen Gelegenheiten an den Eiweißkörpern gewonnen wurden, mahnen zu einiger Vorsicht. Durch die Untersuchungsmethoden, wie sie hier zur Anwendung kamen, werden gewisse Bedingungen festgestellt, unter welchen das Auftreten einer festen Phase in einer Eiweißlösung zu beobachten ist. Nicht untersucht wird die chemische Zusammensetzung dieser Phase. Allein erst durch die Sicherstellung der chemischen Identität der Phasen in den verglichenen Fällen wird der Beweis vollständig, daß nicht Ähnlichkeit, sondern Gleichheit der betreffenden Zustandsänderungen von Eiweiß vorliegt. Daß beispielsweise bei den Eiweißfällungen durch Schwermetallsalze im verdünnten Zustande das kolloidale Metallhydroxyd mit den Proteïnen unlösliche Verbindungen eingeht, während die durch hochkonzentrierte

Schwermetallsalze bewirkten Fällungen den Neutralsalzniederschlägen der Eiweißkörper analog sind, daß bei der Lösung der ersten Schwermetalleiweißfällung im Überschusse der Komponenten völlig verschiedene Komplexe in der flüssigen Phase vorhanden sind und ebenso im Falle der Proteïnfällung durch gewisse hochkonzentrierte Schwermetallsalze (z. B. Zinksulfat), alles dies sind Erfahrungen, die erst eine Spezialuntersuchung lehrt.

Einem Übersichtsbilde dieser Zustandsänderungen, welches, etwa nach dem Vorgange von Galeotti[1]), nur den Unterschied fest und flüssig und die prozentische Zusammensetzung der Phasen registriert, sind, so wertvolle Hinweise es enthalten mag, diese wesentlichen chemischen Verschiedenheiten der Phasen nicht zu entnehmen. Auf diesem Wege kann man leicht dahin geführt werden, das Bestehen verschiedener Globuline nebeneinander zu bestreiten, welches anderweitig sichergestellt ist.

Als besonders beweiskräftig für die Identität von Säureeiweißfällung in der Wärme und Kälte könnte der stetige Übergang der betreffenden Koagulationspunkte (Fig. 2) von den höheren zu den niederen Werten betrachtet werden. Allein auch hier fordert das Auftreten von Inflexionspunkten der Kurven bei den Übergangstemperaturen zu einiger Zurückhaltung auf. Unter diesen Umständen wurde das Augenmerk immer wieder auf die Prüfung von Verschiedenheiten zwischen den bei hoher und niederer Temperatur gewonnenen Koagulaten gelenkt. Geht man davon aus, daß die Zustandsänderung des Säureeiweißes durch Elektrolyte in der Wärme und Kälte identisch und im ersten Falle nur ein weiter fortgeschrittenes Stadium des Prozesses bei niederer Temperatur darstellt, dann mußte man erwarten, durch Erwärmen die schon in der Kälte erzielte Koagulation steigern zu können. Überraschenderweise findet sich unter bestimmten Verhältnissen typisch das Gegenteil, eine Rückbildung des in der Kälte gebildeten Koagulates durch die Temperatursteigerung. Es kommt dabei oft bis zur vollständigen Klärung einer trüben oder selbst flockigen Niederschlag enthaltenden Flüssigkeit.

Belege dafür sind in der schon angeführten Tabelle XIV enthalten, welche die Kältefällung und Hitzekoagulation von Säureeiweiß bei Anwesenheit von Nitrat wiedergibt. Hier sind sämtliche Versuche derart angestellt, daß die Zustandsänderung bei Zimmertemperatur sofort nach der Mischung der Probe, dann nach

[1]) Galeotti, Zeitschr. f. physiol. Chemie 40, 492.

24stündigem Stehen derselben verzeichnet wurde. Darauf wurde dieselbe Probe zum Sieden erhitzt und abermals die unmittelbar dabei und nach weiteren 24 Stunden Zimmertemperatur wahrgenommene Zustandsänderung notiert. Während in den Versuchen mit niederem Säuregehalt (0,005 n und 0,01 n-HCl) die in der Kälte entstandene Fällung beim Erhitzen in eine mächtige grobflockige Koagulation übergeht, kommt es bei 0,02 n und 0,025 n-HCl, also nachdem der Säureeinfluß eine gewisse Konstanz erreicht hat, ausnahmslos zur Rückbildung der in der Kälte entstandenen festen Phase durch Erwärmen. Erst beim Stehenlassen oder Abkühlen bildet sich wieder ein Niederschlag, der zumeist reichlicher ist als der erste in der Kälte entstandene.

Die Rückbildung der Kältefällung beim Erhitzen ist auch aus den folgenden Versuchen am Rhodanid ersichtlich. Die Angaben in einer Horizontalreihe entsprechen den Veränderungen, welche nacheinander an derselben Probe bei niederer und höherer Temperatur zu beobachten waren.

Tabelle XVII.
Überall 0,02 n-HCl.

KSCN	Zimmertemperatur		Gekocht	
	sofort	nach 24 Std.	sofort	nach 24 Std.
0,05 n	klar	opaleszent	klar	opaleszent
0,1 n	klar	milchig durchscheinend	klar	milchig durchscheinend
0,15 n	milchig durchscheinend	grobflockig abgesetzt v. schwach trüber Flüssigkeit	milchig durchscheinend	gallertig opak

Nach unseren zahlreichen einschlägigen Erfahrungen ist diese Reversibilität der Kältefällung von Säureeiweiß durch Erwärmen eine gesetzmäßige Erscheinung, die ganz auffallend an das ähnliche Verhalten von Albumosen erinnert. Dadurch ist eine neue Beziehung zwischen den Reaktionen der Albumosen und der genuinen Eiweißstoffe hergestellt, welche gelegentlich auch von praktischer Bedeutung werden kann. Es sei hier nur an den Bence-Jonesschen Körper erinnert, der ähnliche Rückbildungsverhältnisse des Niederschlages beim Erwärmen zeigt und nach neueren Untersuchungen den eigentlichen Eiweißstoffen näher stehen soll als den Albumosen.

Eine letzte Entscheidung der Frage, ob das Koagulat bei der Fällung von Säureeiweiß in der Kälte und Wärme identisch ist, haben auch diese Versuche nicht gebracht. Wie aus den Tabellen ersichtlich, folgt stets der Lösung des Kältekoagulates durch Erwärmen eine neuerliche Ausflockung beim Abkühlen und Stehen der Probe. Wurde der jetzt gebildete Niederschlag wieder erwärmt, so kam es ebenso wie beim ersten Male zur Klärung der Lösung, und dieser Vorgang konnte durch Abkühlen und Wiedererwärmen immer wiederholt werden, er läßt sich selbst nach monatelangem Stehen der Probe in der gleichen Weise reproduzieren. Es hat sich also ein neuer und unerwarteter Übergang des Verlaufes der Zustandsänderungen von Säureeiweiß in der Kälte und Wärme ergeben.

Dennoch möchte ich eine völlige Identität der Phasen bei beiden Ausflockungen nicht annehmen, sondern neige zu der Ansicht, daß eine wenn auch nicht tiefgehende Verschiedenheit der Koagulate in beiden Fällen vorliegt. Diese Vermutung stützt sich zum Teil auf den differenten physikalischen Charakter der betreffenden Niederschläge. Bei der Säureeiweißfällung durch Elektrolyte in der Kälte werden im allgemeinen rasch sich absetzende, kohärente, wasserarme Flocken gebildet, während diese in Anwesenheit der gleichen Elektrolyte bei der Hitzegerinnung eine mehr gallertige oder stärker gequollene lockere Beschaffenheit verraten und sich schwerer absetzen. Häufig schwimmen sie sogar, begünstigt durch den geringen Unterschied im spezifischen Gewicht, an der Oberfläche der Lösung, wohl durch unmerkliche Gasblasen getragen, was bei in der Kälte erhaltenen Koagulis jedenfalls selten sein muß, da es niemals in unseren zahlreichen Versuchen zur Beobachtung kam.

So weit reichen zurzeit die tatsächlichen Ergebnisse unserer Untersuchung, deren Fortsetzung und Ausdehnung auf die Zustandsänderungen von Alkalieiweiß und auf die Alkoholproteïnfällung bereits vor längerer Zeit in Angriff genommen wurde. Aus diesem Grunde mögen hier nur einige *vorläufige* theoretische Andeutungen Platz finden, während eine ausführlichere theoretische Darstellung dem Abschluß der ganzen Versuchsserie vorbehalten sein soll.

Durch die Feststellung, daß für einen gewissen Säuregrad — bei Vermeidung des Gebietes der Kältefällung — eine Grenze des Salzgehaltes besteht, über die hinaus eine Vermehrung des Salzes für die Hitzekoagulation gleichgültig ist, und durch die gleiche

Geltung dieses Satzes für konstante Salz- und variable Säurekonzentration, wird die Vorstellung einer Art chemischen Verbindung von Säure und Salz mit dem Eiweiß nahe gelegt. Denn die Eigenschaften des Reaktionsproduktes erscheinen hier an diskrete reagierende Mengen der Komponenten geknüpft und ein Überschuß über dieselben bleibt an den Vorgängen unbeteiligt.

In den vorliegenden Versuchen prägt sich eine noch engere Beziehung aus. Bei einem bestimmten Säuregrade (vgl. Fig. 1) tritt die Konstanz der Wirkung für verschiedene Salze bei fast der gleichen Konzentration ein. Dieselbe betrug etwa 0,2 n (bei 0,005 n-HCl) für die von uns stets gebrauchte Eiweißmenge von etwa 0,105 g. Die zur Herstellung eines bestimmten Koagulationsgrades notwendige Salzkonzentration wächst zunächst mit dem Säuregehalte. Über eine gewisse Grenze der Acidität hinaus hat eine weitere Vermehrung der Säuerung keine erhebliche Rückwirkung auf den zur Koagulation erforderlichen Salzgehalt. Auch diese Aciditätsgröße fällt für die verschiedenen Salze nahe zusammen. Sie bewegt sich in allen untersuchten Fällen innerhalb der Werte 0,015 und 0,02 n-HCl.

Alle diese Tatsachen drängen dazu, bei der Hitzekoagulation von Säureeiweiß die Bildung einer Art von Eiweißdoppelsalzen anzunehmen, zu welchen sich das durch Addition der Säure an das durch Hitze „denaturierte" Proteïn gebildete Eiweißsalz mit den zugefügten Elektrolyten, oder einer Eiweißverbindung[1]) desselben, vereinigt. Die sichtbaren Vorgänge bei der Hitzekoagulation bilden nur den Ausdruck für die Löslichkeitsverhältnisse der entstandenen Eiweißdoppelsalze. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß für eine Säure und ein Salz, je nach den für die Reaktion verfügbaren Mengen beider, eine Reihe verschiedener Eiweißsalze existiert, die in bezug auf den Gehalt an Säure und Salz nach oben schärfer begrenzt ist. Die früher angegebenen Grenzwerte von Säure und Salz, die zu einer bestimmten Eiweißmenge gehören, müssen nicht auch jene Quantitäten vorstellen, die mit dem Eiweiß wirklich verbunden sind. Nach allen bisherigen Erfahrungen werden wir vielmehr eine starke Neigung zum hydrolytischen Zerfall bei den sauren Eiweißsalzen voraussetzen. Dann wird ein Teil der in Lösung befindlichen Säure und des Salzes dazu dienen, die Hydrolyse soweit zurückzudrängen, bis die Eiweißlösung ein

[1]) Auf die so wertvollen Beiträge von T. Brailsford Robertson zur Frage der Ionenproteïde (The journal of biological chemistry 2, 317 etc.) soll nach einem gewissen Abschlusse unserer Arbeiten eingegangen werden.

annähernd konstantes Verhalten zeigt. Die gefundenen Grenzwerte von Salz und Säure wären somit eine Summe der gebundenen und der zur Unterdrückung der Hydrolyse nötigen Mengen.

Mit der Annahme der Eiweißdoppelsalze und einer Verschiedenheit derselben bei hoher und niederer Temperatur wäre auch die folgende Erfahrung gut zu vereinen, welche mit dem als Regel bekannten Einflusse der Temperatur auf die Löslichkeit von Salzen übereinstimmt. Bei der Koagulation von Säureeiweiß kommt nur der Fall einer Lösung des in der Kälte vorhandenen Koagulates durch Erwärmen vor, nicht aber das umgekehrte, Lösung eines in der Hitze unlöslichen Koagulates beim Abkühlen.

Durch kurzes Erhitzen des Säureeiweißes wird ein großer Teil seiner physiko-chemischen Beziehungen nicht geändert, ein Zeichen, daß auch die chemischen Veränderungen dabei nicht allzu tief greifen werden. Dafür sprechen die vielen Gemeinsamkeiten zwischen Säureeiweißfällung in der Kälte und Wärme, und vor allem der vielfache Parallelismus in bezug auf die Löslichkeitsverhältnisse der Koagulate in beiden Fällen, soweit sie durch die Anionen der zugesetzten Salze bestimmt sind.

Besonders auffallend ist diese Ähnlichkeit der Löslichkeiten z. B. bei den Nitraten und Rhodaniden, hingegen würden die Acetate in der Kälte und Wärme Eiweißdoppelsalze bilden, die sich schon recht verschieden verhalten. In der Kälte gebildete Acetate des Säureeiweißes sind überaus löslich, die mit erhitztem Säureeiweiß gebildeten sind unlöslich.

Die in diesen Untersuchungen besonders schön hervortretenden Übergänge von Kolloidchemie im engeren Sinne zu den typischen chemischen Reaktionen, sollen später noch eine eingehende Erörterung finden. Über die wohl weiter, als es gegenwärtig den Anschein haben mag, reichende biologische Bedeutung der Eiweißdoppelsalze sind bereits an unserem Institute Untersuchungen begonnen worden, zu denen nun die beste Gelegenheit gegeben ist durch dessen organische Angliederung an die mit allen modernen Behelfen ausgestattete biologische Versuchsanstalt.

IV.

Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und die Acidose.

Von **Julius Baer** und **Léon Blum.**

Aus der medizinischen Klinik zu Straßburg (Prof. v. Krehl).

Beim schweren Diabetes melitus treten im Harn Oxybuttersäure, Acetessigsäure und Aceton, in der Atemluft nur Aceton, in oft beträchtlicher Menge auf, eine Erscheinung, die man unter Hervorheben der wichtigsten Seite der Störung, der übermäßigen Säureausscheidung oder der erhöhten Säurebildung im Organismus, als Acidose bezeichnet hat. Dieselben Substanzen finden sich auch bei gewissen Ernährungsbedingungen, die mit dem schweren Diabetes den Ausfall oder die geringe Verwertung von Kohlehydraten gemeinsam haben.

Bei Tieren lassen sich die gleichen Störungen, die zur Acidose führen, experimentell unter verschiedenen Bedingungen hervorrufen.

Für die Oxybuttersäure und ihre Derivate erhebt sich nun die gleiche Frage, wie für alle Substanzen, die bei Stoffwechselstörungen im Harn auftreten und unter normalen Verhältnissen nicht darin vorkommen: Stellen sie intermediäre Stoffwechselprodukte dar, die nur im Überschuß gebildet werden, oder die in normaler Menge erzeugt, aber unvollkommen verbrannt werden? Oder handelt es sich um Stoffe, die normalerweise überhaupt nicht auftreten? Lassen sich weiterhin zwischen dem Vorkommen dieser Substanzen und unserer Nahrung, bestimmten chemischen Verbindungen in derselben, irgend welche Beziehungen auffinden?

Während für die Acetonkörper eine Lösung der ersten Fragen bisher nicht möglich war, haben zahlreiche Untersuchungen sich mit den Beziehungen der Acetonkörper zu den Hauptbestandteilen unserer Nahrung beschäftigt. Es hat sich dabei ergeben, daß dieselben mannigfach und zugleich recht kompliziert sind.

Zunächst konnte man rein äußerlich eine Trennung durchführen zwischen Substanzen, die die Oxybuttersäureausscheidung verringern und anderen, die eine Vermehrung derselben herbeiführen.

Typische Vertreter der ersten Gruppe stellen die Kohlehydrate dar, deren Zufuhr im entgegengesetzten Sinne wie ihre Entziehung wirkt und ein starkes Absinken der Acidose zur Folge hat (Hirschfeld[1]).

Der gleiche Effekt wird bei geringerer Zuckerausscheidung, also durch „gesteigerte Toleranz" beim Diabetes melitus erzielt; es mag fürs erste dahingestellt bleiben, wie weit diese Wirkung auf genau gleicher Grundlage, d. h. einer gesteigerten Verbrennung von Zucker selbst beruht.

Schwieriger zu deuten ist die Beeinflussung der Acidose durch Substanzen, die im Organismus eine Paarung mit Glykuronsäure eingehen (Baer[2]), wobei jedenfalls eine Zufuhr von verbrennbaren kohlehydratähnlichen Produkten von außen nicht erfolgt.

Bei den Stoffen, die eine Steigerung der Acetonkörperausscheidung bewirken, gestalten sich die Verhältnisse verwickelt insofern, als für sie mehrere Momente in Betracht kommen: Einmal können Körper eine Vermehrung von Oxybuttersäure herbeiführen, weil sie selbst in Oxybuttersäure übergehen; eine weitere Möglichkeit ist, daß Substanzen indirekt die Entstehung oder die Ausscheidung der Acetonkörper beeinflussen.

Die Oxybuttersäure kann, wie wir in früheren Arbeiten gezeigt haben[3]), aus chemisch weit voneinander entfernten Substanzen entstehen. Diese direkte Wirkung auf die Oxybuttersäureausscheidung muß natürlich bei experimentellen Untersuchungen in erster Linie in Betracht gezogen werden.

Weniger exakt und zahlreich sind unsere Erfahrungen über den zweiten Punkt, Vermehrung der Acetonkörperausscheidung durch Substanzen, die nicht selbst in Oxybuttersäure übergehen. Ein Beispiel hierfür bietet schlechtere Ausnutzung der Kohlehydrate, also gesteigerte Zuckerausfuhr bei gleicher Nahrungs-

[1]) Zeitschr. f. klin. Medizin 28, 92.
[2]) Ebenda 56, 198.
[3]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 55, 91 u. 56, 92.

zufuhr, die eine Steigerung der Oxybuttersäureausscheidung zur Folge hat. Experimentell können wir diesen Zustand z. B. durch Phlorizin hervorrufen.

Weiterhin hat Magnus Levy[1]) einwandfrei nachgewiesen, daß Zufuhr von Alkali unter im übrigen gleichen Bedingungen Steigerung der Oxybuttersäureausscheidung, Wegfall des Alkalis eine Verringerung derselben herbeiführt. Im wesentlichen dürfte diese Alkaliwirkung durch günstigere Ausscheidungsverhältnisse der Säuren und darum geringere Verbrennung bedingt sein.

Becker und andere[2]) behaupten, daß die Narcotica eine spezifisch steigernde Wirkung auf die Acetonkörperausscheidung ausüben.

Im Hinblick auf diese Erörterungen scheint es uns jedenfalls nicht angebracht, rein äußerlich nach ihrer doch ganz ungleichartigen Wirkung ketogene und antiketogene Substanzen zu unterscheiden, wie dieses Satta[3]) vorgeschlagen hat.

Für das Verständnis und die experimentelle Forschung bildet diese Bezeichnung, so prägnant sie auch zu sein scheint, eher ein Hindernis, wie sich besonders aus dem Folgenden noch ergeben wird.

Wir halten es für zweckmäßiger, eine Unterscheidung zu treffen in Substanzen, die im Organismus in Oxybuttersäure übergehen können, und in solche, die ihre Bildung und Ausscheidung indirekt beeinflussen[4]).

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit dem letzten Gebiet beschäftigt. Außer den bereits erwähnten Arbeiten Hirschfelds über die Wirkung der Kohlehydrate liegen Versuche über den Einfluß verschiedener anderer den Kohlehydraten näher oder ferner stehender Körper vor. Für das Glycerin hat Hirschfeld[5]) ebenfalls einen vermindernden Einfluß auf die Acetonausscheidung festgestellt, für die Glykonsäure fand Schwarz[6]) das gleiche Verhalten, das allerdings Loeb und Mohr[7]) nicht regelmäßig be-

---

[1]) Magnus Levy, Arch. f. exper. Pathol. 42, 149 u. 45, 389.

[2]) Deutsch. med. Wochenschr. 1894.

[3]) Diese Beiträge 6, 1.

[4]) Ob man die Alkaliwirkung in eine besondere Gruppe unterbringen will oder muß, ist hier nebensächlich; jedenfalls darf aber ihre Wirkung auf Aceton- und Oxybuttersäureausscheidung im Urin bei experimentellen Untersuchungen nie vernachlässigt werden, wie dieses meistens geschieht.

[5]) Zeitschr. f. klin. Medizin 28, 176.

[6]) L. Schwarz, Deutsch. Arch. f. klin. Medizin 76, 259.

[7]) Loeb u. Mohr, Centralbl. f. Stoffwechsel- u. Verdauungskrankheiten 3, Nr. 8.

stätigen konnten. Satta (l. c.) untersuchte andere von den Kohlehydraten weiter abstehende Substanzen, die Weinsäure, Citronensäure, Milchsäure und die Malonsäure. Mit Ausnahme der Malonsäure nahm Satta für diese Stoffe eine die Acidose herabsetzende Wirkung an; die dabei beobachteten Ausschläge waren jedoch, zum Teil infolge der ungünstigen Versuchsanordnung, sehr gering.

Die Frage der Beziehungen der Kohlehydrate zu den Eiweißkörpern und die Annahme, daß aus Eiweißspaltungsprodukten Zucker im Organismus entstehen kann, waren Veranlassung, Derivate der Proteïnsubstanzen und diesen ähnliche Stoffe in ihrer Wirkung auf die Acetonkörperausscheidung zu prüfen. Über solche Versuche haben Borchardt und Lange[1]) ganz kürzlich berichtet. Bei reiner Fleischfettdiät prüften sie die Einwirkung von Aminosäuren, Glykokoll, Alanin, Glutaminsäure, Asparagin und Leucin, auf die Acetonausscheidung. Alanin, Glutaminsäure und Asparagin brachten eine Verminderung hervor, die Wirkung des Glykokolls war unsicher; nach Darreichung von Leucin (28 und 30 g) war eine Vermehrung des Acetons von mehr als 0,5 g und möglicherweise noch eine Steigerung am Nachtage vorhanden.

Es sind diese Ausschläge verhältnismäßig groß, wenn man bedenkt, daß in einem unserer Versuche[2]) von 10 g l-Oxybuttersäure bei gleichzeitiger Alkalidarreichung nur 0,4 g im Urin wiedererschienen, von 22 g Isovaleriansäure nur 2,8 Proz. der theoretisch möglichen Menge als Oxybuttersäure ausgeschieden wurden.

Borchardt und Lange haben das Fehlen bzw. die Menge der Oxybuttersäure nicht im Ätherextrakt, sondern im Urin festgestellt. Nun entsprechen Drehungen von $\mp$ 0,05, die kaum außerhalb der Ablesungsfehlergrenze liegen, bei 1000 ccm schon etwa 1 g Oxybuttersäure, Mengen, die bei den Zahlen dieser Versuche ganz erheblich in Betracht kommen, also ihre Resultate noch wesentlich verschieben könnten.

Im Gegensatz zu unseren früheren Versuchen und auch zu diesen Resultaten von Borchardt und Lange kommt Mohr[3]) nach Versuchen an einer Hungerkünstlerin zu dem Schluß, daß aus Leucin keine Acetonkörper entstehen[4]).

---

[1]) Diese Beiträge 9, 3 u. 4 (1907).

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 55, 107.

[3]) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Therapie 3.

[4]) Mohr behauptet auf Grund dieser Versuche, daß unsere Experimente für die Entstehung von Oxybuttersäure aus Leucin und somit aus Eiweißkörpern nicht beweisend sind. Wenn er unseren Versuchen einen

Zu Beginn unserer Versuche, die wir vor drei Jahren begannen, hofften wir durch den Nachweis eines Einflusses von Amino- und Oxysäuren auf die Acidose einen Beitrag zur Frage über die Beziehung von Zucker zu Eiweißspaltungsprodukten liefern zu können. Im Laufe unserer Versuche trat jedoch diese Frage, die inzwischen vielfach erörtert worden ist und durch die Versuche von Embden und Salomon[1]) an pankreaslosen Hunden sicher entschieden sein dürfte, infolge anderer Befunde in den Hintergrund.

Wir stellten unsere Versuche an Hunden an, die im Hungerzustande Phlorizin subcutan erhielten. Baer[2]) hat gezeigt, daß unter diesen Bedingungen bei Hunden, die hungern oder trotz Fütterung im Stickstoffdefizit sich befinden, eine Acidose zustande kommt. Innerhalb einer gewissen Zeit nimmt die Ausscheidung

---

gleichwertigen, d. h. unter denselben Versuchsbedingungen ausgeführten entgegengestellt hätte, so würde es sich wohl lohnen, auf eine Erörterung der Ursache der Differenzen einzugehen. Mohr hat aber seine Schlüsse auf Grund von Untersuchungen am Hungernden gezogen, für den nicht einmal bekannt ist, wie anerkannte Oxybuttersäurebildner, z. B. Oxybuttersäure, Buttersäure oder Isovaleriansäure, wirken. Abgesehen von dem Fehlen dieser notwendigen Vor- und Kontrollversuche werden die Resultate aber noch weiterhin dadurch unklar, daß Mohr am Tage nach der Eingabe der recht kleinen Leucinmenge eine weitere Substanz, Glykokoll, verfütterte; es muß infolgedessen die Möglichkeit offen bleiben, daß die auf Rechnung des Glykokolls gesetzte Oxybuttersäurevermehrung noch dem Leucin zuzuschreiben ist.

Ein anderer Einwand, den Mohr gegen unsere Versuche erhebt, sind die starken Schwankungen in der Oxybuttersäureausscheidung. Gerade diese Unregelmäßigkeiten, die bei Koständerung, und auch ohne solche, schwer zu vermeiden sind, veranlaßten uns, während 12 Tagen, trotz täglicher Bestimmungen, keine Versuche anzustellen; wir gaben das Leucin erst, als die Ausscheidung drei Tage lang annähernd konstant geblieben war; ja würden wir nach dem Vorgehen anderer Autoren, z. B. Mohr selbst, das Mittel der Oxybuttersäurewerte zweier Tage nehmen, so könnten wir eine Vorperiode von fünf Tagen mit konstanter Ausscheidung rechnen. Die meisten Autoren, z. B. Loeb, Loeb und Mohr, Schwarz, haben sich in ihren Versuchen mit der doch in ihrer Wirkung anerkannten Buttersäure auf eine viel geringere Zahl von Vortagen beschränkt. Auf diese Weise entziehen sich natürlich weiter zurückliegende Schwankungen der Oxybuttersäureausscheidung der Beurteilung. Trotz alledem wäre uns selbst eine Wiederholung des Versuches erwünscht gewesen, sie scheiterte jedoch an dem Mangel geeigneter Patienten.

Die prinzipielle Frage, ob auch aus Eiweiß im Organismus Oxybuttersäure entstehen kann, ist nach unserer Auffassung durch die erwähnte und unsere spätere Arbeit für verschiedene Spaltungsprodukte mit ziemlicher Sicherheit erledigt. Bei geeigneter Gelegenheit werden wir übrigens zur Entscheidung anderer Fragen auf solche Leucinversuche zurückkommen.

[1]) Diese Beiträge 5, 507; 6, 63.

[2]) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 51, 271.

der Acetonkörper von Tag zu Tag zu. Zufuhr von Zucker oder von genügenden Mengen Eiweiß, die vor N-Verlust schützen, bringt die Acidose zum Schwinden.

Infolge dieses fast gesetzmäßigen Verhaltens — dessen Richtigkeit wir in zahlreichen Versuchen bestätigt fanden — war es möglich, unter günstigen Bedingungen den Einfluß von Substanzen auf die Acidose zu prüfen. Stoffe, die ähnlich wie die Kohlehydrate wirkten, mußten eine Verminderung der Acetonkörperausscheidung herbeiführen. Ein Absinken war bei dieser Versuchsanordnung um so beweisender, als die Körper in Form ihrer Alkalisalze oder mit den entsprechenden Mengen Alkali gegeben wurden, dessen ausschwemmende Wirkung bereits oben erörtert wurde. Ein Ausbleiben des täglichen Anstiegs der Acetonkörperausscheidung bewies daher bereits eine Wirkung. Freilich konnte bei schwacher Wirksamkeit oder bei starker Acidose unter diesen Umständen der Einfluß durch das Ansteigen ganz verdeckt werden. Weiteres Anwachsen bei starker Acidose gibt daher keinen sicheren Entscheid über die Unwirksamkeit einer Substanz. Wenig oder überhaupt nicht wirkende Stoffe lassen sich demnach nicht unterscheiden. Daß die gewählten Versuchsbedingungen eine Entscheidung der Frage, ob aus einer Substanz Oxybuttersäure entstehen kann oder nicht, nicht gestattet, müssen wir nicht besonders hervorheben.

Wir verfuhren folgendermaßen:

Hunde erhielten nach dreitägigem Hungern bei beliebiger Wasserzufuhr subcutan Phlorizin; die Menge wechselte je nach der Größe des Tieres und der Stärke der Acidose, die erzielt werden sollte. Das Phlorizin wurde immer in der gleichen Menge Alkohol (2,5 ccm) und nach Verdünnung mit dem gleichen Volumen Wasser eingespritzt. In der Mehrzahl der Versuche wurde am Tage nach der ersten Phlorizindarreichung keine Bestimmung ausgeführt, da die Acidose an diesem Tage meist noch sehr schwach ist.

Vor der jedesmaligen Phlorizininjektion wurde der Urin durch Katheterisieren entleert. Am vierten Phlorizintage erfolgte die subcutane Injektion der zu prüfenden Substanz, die auf einmal oder in zwei Teilen gegeben wurde.

Im Harn wurde der Zucker polarimetrisch, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, das Aceton nach Messinger-Huppert nach zweimaliger Destillation titriert. Die Oxybuttersäurebestimmnngen wurden nach der Methode von Magnus-Levy durch Polarisation des aus dem Urin erhaltenen Ätherextraktes vorgenommen[1]).

[1]) Es erscheint uns nicht berechtigt, wenn verschiedene Autoren diese Methode infolge geringer nebensächlicher Abänderungen (Form des Extraktionsapparates!) mit ihrem Namen belegen. Höchstens wird hierdurch die

Bei der Durchführung gingen wir derart vor, daß wir die verschiedenen Säuren mit gleicher Zahl der C-Atome in ihrer Wirkung prüften: zunächst die gesättigten Fettsäuren selbst, sodann die entsprechenden Oxy- und Aminosäuren.

Unter den Substanzen mit 2 C-Atomen untersuchten wir das Verhalten der Essigsäure, Glykolsäure (Oxyessigsäure) und des Glykokolls (Aminoessigsäure).

Essigsäure.

Versuch I.

Gewicht des Hundes: 7150 g. 1,1 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,133	21,8	85,0	0,144	
3.	6,902	21,4	155,9	0,299	
4.	7,132	22,0	255,0	0,600	6,1 g essigsaures Natron

Versuch II.

Gewicht des Hundes: 9600 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	10,08	20,0	304,3	0,51	
3.	7,32	19,0	329,3	1,14	
4.	6,40	14,0	338,8	1,78	25 g essigsaures Natron

In beiden Versuchen stieg die Ausscheidung der Acetonkörper trotz der Essigsäuredarreichung weiter an. Daß hieraus nicht auf das Fehlen jeglicher Wirkung geschlossen werden kann, haben wir bereits hervorgehoben. Geringer Einfluß braucht bei unserer Versuchsanordnung nicht zum Ausdruck zu kommen, da er durch den täglichen Anstieg der Acetonkörperausscheidung verdeckt werden

Beurteilung erschwert, nach welcher Methode, d. h. wie zuverlässig gearbeitet worden ist. Von Magnus-Levy stammt die Vorschrift, den eingeengten, mit Ammonsulfat versetzten, angesäuerten Urin im Ätherstromapparat zu extrahieren und im Extraktionsrückstande die Säure durch Polarisation zu bestimmen. Auf die Fehlerquellen dieser Methode haben Geelmuyden (Festschrift für Hammarsten 1906) und auch wir (l. c.) ausführlich hingewiesen.

kann. Es scheint uns jedoch das Ausbleiben jeder Beeinflussung im zweiten Versuch bei sehr hohen Essigsäuregaben für das Fehlen einer Wirkung zu sprechen.

Glykolsäure.

Versuch III.

Gewicht des Hundes: 7500 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	8,79	21,5	206,0	0,673	
3.	8,34	22,5	309,1	0,849	7,5 g glykolsaur. Natron [1]

Versuch IV.

Gewicht des Hundes: 7700 g. 1,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,25	23,5	153,4	0,235	
3.	8,75	22,5	204,8	0,336	
4.	7,078	20,0	177,3	0,243	7,5 g Glykolsäure

In dem ersten Glykolsäureversuche war schon vom zweiten Tage an eine erhebliche Acidose vorhanden; ein Einfluß der injizierten Säure läßt sich aus schon erörterten Gründen nicht aus ihm erkennen. Unzweideutig tritt aber die Wirkung im Versuche IV hervor, bei dem wegen viel schwächerer Acidose die Versuchsverhältnisse günstiger lagen. Die Zucker- und Stickstoffausscheidung erfahren keine wesentliche Änderung.

Glykokoll.

Borchardt und Lange (l. c.) fanden in zwei Versuchen, deren erster durch dyspeptische Erscheinungen gestört war, einmal eine geringe Vermehrung, einmal eine Verminderung von 0,25 g Aceton nach Darreichung von je 40 g und 30 g Glykokoll. Mohrs Versuch an einer Hungerkünstlerin und die Gründe, weshalb er nicht verwertbar ist, wurden bereits oben erwähnt.

[1] Da das Versuchstier schon am zweiten Tage stark ausgesprochene Acidose aufwies und ziemlich krank aussah, wurde die Injektion bereits am dritten Tage gemacht.

Versuch V.

Gewicht des Hundes: 5640 g. 1,1 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	6,64	16,9	80,50	0,176	
3.	6,70	14,1	258,8	0,295	
4.	6,05	15,3	254,0	0,466	5,2 g Glykokoll mit berechneter Menge $NaHCO_3$

Versuch VI.

Gewicht des Hundes: 8100 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,32	25,0	101,6	0,0932	
3.	5,86	25,5	215,7	0,388	
4.	9,13	27,5	265,6	0	12,6 g Glykokoll + berechnete Menge $NaHCO_3$

Die Wirkung des Glykokolls gleicht ganz und gar der der Glykolsäure: bei ihrer nahen chemischen Verwandtschaft und der Möglichkeit eines Überganges von Glykokoll in Glykolsäure im Organismus, auf die man nach Analogien schließen darf, bietet dieses Resultat nichts Unerwartetes; auch in der Stärke ihrer Wirkung scheinen beide Substanzen sich gleich zu verhalten. Im Versuch V kommt bei kleiner Glykokollmenge die vermindernde Eigenschaft nicht zum Ausdruck, ähnlich wie in Versuch III die Glykolsäure gegen die stärkere Acidose unwirksam war. Im Versuch VI, in dem die Acetonkörperausscheidung etwa ebenso stark wie im Versuch V war, ist bei der doppelten Glykokolldosis der Einfluß auf die Oxybuttersäure evident, während die Acetonausscheidung noch etwas ansteigt. Eine außerhalb der Fehlergrenzen liegende Wirkung auf Zucker und Stickstoff ist nicht erkennbar.

Wegen der nahen Beziehungen der Milchsäure zu den Kohlehydraten verdient das Verhalten dieser und der ihr nahestehenden Substanzen besonderes Interesse. Wir prüften die Propionsäure, die dazu gehörige α-Oxy- und α-Aminosäure, die Milchsäure und das Alanin.

Propionsäure.

L. Schwarz (l. c.) hat bereits bei einem Diabetiker 30 g Propionsäure verfüttert; er fand bei seiner Versuchsanordnung keine Verminderung der Oxybuttersäureausscheidung, sondern eher eine Vermehrung derselben.

Versuch VII.

Gewicht des Hundes: 6600 g. 1 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	9,79	30,24	82,0	0,2018	
3.	11,26	31,2	297,5	1,192	
4.	9,72	33,0	255,0	0,745	7,9 g propions. Natrium

Versuch VIII.

Gewicht des Hundes: 7500 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,83	23,0	151,5	0,124	
3.	8,04	21,0	419,3	0,432	
4.	6,75	21,5	339,3	0,276	5,6 g propions. Natrium

In beiden Versuchen ist eine deutliche Verminderung der Acetonkörper vorhanden, während Zucker- und Stickstoffausscheidung keine gleiche Änderung aufweisen.

Milchsäure.

Versuch IX.

Gewicht des Hundes: 6000 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,57	35,0	147,6	0,39	
3.	8,05	38,0	287,5	1,346	
4.	5,45	34,0	177,3	0,59	6,2 g milchs. Natrium. Der Hund stirbt wenige Stunden nach Beendigung des Versuches an hämorrhagischer Enteritis.

Versuch X.

Gewicht des Hundes: 8970 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	10,17	28,0	13,5	0,3	
3.	10,10	29,5	348,0	0,466	
4.	9,02	33,0	314,0	0,522	8,5 g Milchsäure mit $NaHCO_3$ neutralisiert

Der Einfluß der Milchsäure auf die Acidose ist unverkennbar, in Versuch X fehlt wenigstens ein weiteres Ansteigen der Acidose. Ob die im Versuch X beobachtete Steigerung der Zuckerausscheidung auf eine Zuckerbildung aus Milchsäure hinweist, können wir nicht entscheiden.

Alanin.

Versuch XI.

Gewicht des Hundes: 7900 g. 1,1 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,28	19,0	101,6	0,088	
3.	7,28	19,5	287,5	0,155	
4.	7,80	21,5	120,8	0	10 g Alanin mit berechneter Menge $NaHCO_3$

Das Alanin verhält sich in seiner Wirkung gleich der entsprechenden Oxysäure, der Milchsäure.

Säuren mit 4 C-Atomen haben wir nicht untersucht. Von der Buttersäure ist der Übergang in β-Oxybuttersäure bekannt. Isobuttersäure geht nach unseren Versuchen an Menschen zum Teil wenigstens in Milchsäure über und könnte darum ähnlich wie diese und die Propionsäure wirken. Wahrscheinlich ist es, daß auch die normale Säure mit 5 C-Atomen, die Valeriansäure, die nach unseren und Embdens Versuchen keine Oxybuttersäure und Aceton liefert, vermindernd auf die Acidose wirkt[1]). Ob dies dann weiter-

[1]) Jedenfalls möchten wir diese Behauptung mit derselben Reserve aussprechen wie in unserer ersten Mitteilung (S. 94); wir möchten weiterhin

hin die Regel für die normalen Säuren mit ungerader Zahl von C-Atomen ist, bedarf noch weiterer experimenteller Prüfung.

Wir prüften in unseren weiteren Versuchen noch ein Eiweißspaltungsprodukt aus einer anderen Gruppe, die Glutaminsäure.

Glutaminsäure.

Versuch XII.

Gewicht des Hundes: 7500 g. 1,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	6,90	16,5	78,6	0,248	
3.	6,82	14,0	129,4	0,274	
4.	6,72	16,0	71,9	0,104	6,7 g Glutaminsäure + ber. Menge $NaHCO_3$

Die Wirkung auf die Acidose bei sonst gleichbleibender Zucker- und Stickstoffausscheidung tritt aus dem Versuche genügend hervor.

Die entsprechende Oxysäure, die Oxyglutarsäure, wurde nicht untersucht; dagegen erhielten wir bei Verabreichung der entsprechenden Dicarbonsäure der Glutarsäure unerwartete, eigentümliche Resultate, die uns veranlaßten, uns weiterhin in dieser Arbeit ausschließlich nur mit der Aufklärung ihrer Wirkung zu beschäftigen. Sie brachte nämlich in den ersten Versuchen, die wir mit ihr anstellten, gleichzeitig ein Absinken der Zucker- und der Acetonkörperausscheidung bis nahe an die Normalwerte zustande. Von den bisher geprüften Substanzen läßt keine eine ähnliche Wirkung wie die Glutarsäure erkennen, so daß wir auf die vorangehenden Versuche gerade für diesen Vergleich besonderen Wert legen.

---

betonen, daß Schlüsse, wie sie Borchardt und Lange über diesen Punkt und auch über Zuckerbildung aus Isobuttersäure einzig und allein aus unseren Versuchen gezogen haben, recht gewagt sind: wir haben selbst hervorgehoben (S. 105), daß zur Entscheidung der Frage der Zuckerbildung unsere Versuche nicht geeignet sind. Jedenfalls möchten wir die Verantwortung für solche Schlußfolgerungen ablehnen.

Versuch XIII.

Gewicht des Hundes: 7400 g. 1,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybutter-säure g	Injizierte Substanz
2.	6,32	18,5	387,6	1,547	
3.	6,61	19,5	529,9	1,948	
4.	2,66	2,5	11,8	0	7 g Glutarsäure mit ber. Menge $NaHCO_3$ in zwei Portionen zu je 100 ccm injiziert.

Versuch XIV.

Gewicht des Hundes: 7500 g. 1,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybutter-säure g	Injizierte Substanz
2.	8,27	13,5	288,6	1,785	
3.	8,05	11,4	323,8	2,732	
4.	1,51	< 1,0	106,0	0	10 g Glutarsäure mit ber. Menge $NaHCO_3$ subcutan in zwei Portionen zu je 75 ccm injiziert.

Versuch XV.

Gewicht des Hundes: 5400 g. 1,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybutter-säure g	Injizierte Substanz
2.	4,31	11,9	217,4	0,7866	
3.	8,51	20,5	431,2	4,316	
4.	0,49	< 1,0	117,6	0,07452	7 g Glutarsäure mit ber. Menge $NaHCO_3$ neutralisiert in zwei Portionen zu je 75 ccm injiziert.

Bevor wir uns über die Wirkung der Glutarsäure Aufklärung zu verschaffen suchten, war festzustellen, ob diese Eigenschaft nicht auch anderen, leichter zugänglichen Homologen der Säure zukommt.

In Anbetracht der Resultate, die wir mit der Glutaminsäure (Versuch XII) erhalten hatten, war von vornherein wenig wahrscheinlich, daß die eigentümliche Wirkung allein von der Anwesenheit der zwei Carboxylgruppen abhängt. Wir prüften den Einfluß der Malonsäure, Bernsteinsäure und einer der vier theoretisch möglichen Säuren mit fünf C-Atomen, der Brenzweinsäure (Methylbernsteinsäure). Keine dieser Säuren zeigte eine ähnliche Wirkung.

Malonsäure.

Versuch XVI.

Gewicht des Hundes: 7000 g. 1,3 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,19	20,0	138,0	0,31	
3.	6,44	16,5	305,7	1,65	
4.	8,01	22,0	493,1	2,34	7 g Malonsäure mit entsprechender Menge $NaHCO_3$ neutralisiert
5.	7,19	18,5	138,0	0,25	kein Phlorizin.

Irgend eine Beeinflussung der Acetonkörperausscheidung durch die Malonsäure ist nicht vorhanden. Ebenso bleiben Zucker- und N-Ausscheidung gänzlich unbeeinflußt.

Bernsteinsäure.

Versuch XVII.

Gewicht des Hundes: 8000 g. 1,3 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	6,58	15,5	59	0,15	
3.	5,56	15,2	222	0,784	
4.	4,32	16,7	212	0,23[1])	11 g Bernsteinsäure mit entsprechender Menge $NaHCO_3$ neutralisiert in zwei Portionen zu je 75 ccm injiziert.
5.	4,00	6,0	123	(nicht bestimmt)	kein Phlorizin.

[1]) Im sauren Ätherextrakt beim Eindunsten leicht kristallisierende Substanz.

Versuch XVIII.

Gewicht des Hundes: 9700 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	10,32	28,5	411	0,55	
3.	14,56	33,5	464	0,88	
4.	11,01	34,5	740	1,37	10 g Bernsteinsäure mit entsprechender Menge $NaHCO_3$ neutralisiert in 150 ccm Wasser injiziert.

Im Versuch XVII ist eine Einwirkung auf die Acidose vorhanden, im Versuch XVIII tritt sie bei der stärkeren Acidose des Versuchstieres ganz zurück. Die Wirkung auf die Acetonkörperausscheidung ist also bei der Bernsteinsäure eine schwache, eine Wirkung auf die Zuckerausscheidung ist nicht zu erkennen.

Brenzweinsäure.

Versuch XIX.

Gewicht des Hundes: 12000 g. 1,3 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	10,67	31,0	231,7	0,85	
3.	10,74	28,5	305,7	1,25	
4.	10,37	28,7	221,9	0,15 [1])	8,8 g Brenzweinsäure mit berechneter Menge $NaHCO_3$ neutralisiert in 2 Portionen injiziert.
5.	7,77	25,0	310,6	0,19	kein Phlorizin.

Der Einfluß der Brenzweinsäure auf die Acetonausscheidung ist deutlich; wegen der Ausscheidung einer vielleicht rechtsdrehenden, ätherlöslichen, von uns nicht näher untersuchten Substanz ist die wahre Größe der Oxybuttersäureausscheidung nicht sicher anzugeben. Auf Zucker- und Stickstoffausscheidung ist ein Einfluß

[1]) Im Ätherextrakt eine kristallisierende Substanz.

nicht vorhanden. Von den untersuchten Dicarbonsäuren besitzt demnach keine eine der Glutarsäure ähnliche Wirkung.

Der Einfluß der Glutarsäure auf die Zuckerausscheidung konnte auf verschiedene Weise zustande kommen. Es scheinen uns folgende Erklärungsmöglichkeiten am nächsten zu liegen.

1. Die Säure wirkt direkt entgegengesetzt dem Phlorizin selbst, neutralisiert es sozusagen, ähnlich wie ein Gegengift ein Gift neutralisiert und unschädlich macht. Der Einfluß der Glutarsäure wäre dann allein eine Folge dieser Wirkung.

2. Eine direkte Beeinflussung des Phlorizins selbst liegt nicht vor; die Säure bewirkt eine Retention von harnfähigen Substanzen, so daß nicht allein Zucker und Acetonkörper, sondern auch stickstoffhaltige Produkte im Organismus retiniert werden. Es würde hierdurch auch das eigentümliche Verhalten des Stickstoffs und seine extreme Retention (vgl. Versuch XIII u. XV) ihre Erklärung finden.

3. Es handelt sich um eine direkte Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge, die infolge der Phlorizinvergiftung auftreten: der Zuckerausscheidung und Acidose.

Alle diese Möglichkeiten sind einer experimentellen Prüfung zugänglich.

1.

Würde es sich um eine direkte Beeinflussung des Phlorizins durch die Glutarsäure handeln, so müßten gewisse quantitative Beziehungen zwischen Gift und Gegengift zu erkennen sein: kleine Phlorizindosen müßten schon durch geringere Säuremengen in ihrer Wirkung unschädlich gemacht werden als große und umgekehrt. Vor allem war aber zu erwarten, daß Glutarsäuremengen, die bei großen Phlorizindosen die Zuckerausscheidung zum Schwinden brachten, dieses erst recht bei kleinen Dosen vermochten.

Versuch XX.

Gewicht des Hundes: 10600 g. 0,5 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-N g		Zucker g		Injizierte Substanz
2.	1000	8,67		22,5		
3.	1000	9,95		24,0		
4. a)	500	1,71	8,05	4,25	13,25	4,4 g Glutarsäure mit berechn. Menge $NaHCO_3$ in 175 ccm Wasser injiz.
b)	600	6,34		9,0		
5.	1000	6,50		0		kein Phlorizin.

Versuch XXI.

Gewicht des Hundes: 9500 g. 0,3 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-N g		Zucker g		Injizierte Substanz
2.	1000	7,18		21,5		
3.	1000	6,10		17,5		
4. a)	300	1,43	5,41	4,05	7,55	4,4 g Glutarsäure mit berechn. Menge $NaHCO_3$ in 75 ccm injiziert.
b)	700	3,98		3,5		
5.	1000	2,79		0		kein Phlorizin.

In beiden Versuchen, in denen wir leider das Aceton nicht quantitativ bestimmt haben, ist eine Einwirkung auf die Zuckerausscheidung unverkennbar. Viel weniger ausgesprochen ist der Einfluß auf die Stickstoffausscheidung. Im Vergleich zu der Wirkung der Säure in den früheren Versuchen ist jedoch der Einfluß gering: Während in den Versuchen XIII bis XV durch je 7 g und 10 g Glutarsäure die Wirkung von 1,5 g Phlorizin aufgehoben wurde, konnten hier 4,4 g Säure nicht einmal die durch 0,5 oder 0,3 g hervorgebrachte Zuckerausscheidung zum Schwinden bringen.

Noch stärker tritt dieses Fehlen eines quantitativen Verhältnisses bei ganz kleinen Phlorizinmengen hervor.

Versuch XXII.

Gewicht des Hundes: 7000 g. 0,1 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton Legal	Injizierte Substanz
2.	500	4,56	5,25	—	
3.	600	4,92	7,5	—	
4.	850	6,30	6,4	—	4,4 g Glutarsäure mit berechnet. Menge $NaHCO_3$ neutralisiert.

Versuch XXIII.

Gewicht des Hundes: 8500 g. 0,1 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-N g	Zucker g	Injizierte Substanz
2.	500	5,58	12,0	
3.	650	5,96	13,3	
4.	800	6,52	8,4	4,4 g Glutarsäure mit $NaHCO_3$ neutral.

In diesen Versuchen ist eine Wirkung auf die N-Ausscheidung überhaupt nicht mehr erkennbar, die auf die Zuckerausscheidung gering; im Versuch XXII liegt sie noch innerhalb der Fehlergrenzen.

Eine quantitative Beziehung zwischen der Größe der Zuckerausscheidung und der Wirkung der Glutarsäure ist aus den Versuchen nicht zu erkennen. Die Betrachtung der Resultate ergibt vielmehr das auffallende Ergebnis, daß, je stärker die Zuckerausscheidung und je schwerer die Stoffwechselstörung, die sich in Acidose kundgibt, um so ausgesprochener die Wirkung der Säure ist: Bei starker Acidose und hoher Zuckerausscheidung nach großen Phlorizindosen völliger Schwund des Zuckers und der Oxybuttersäure bei starkem Absinken der Stickstoffausscheidung[1]. In den Versuchen XIV und XV sinkt die Zuckerausscheidung von je 12,4 g und 20,5 g auf 0, im Versuch XIII von 19,5 g auf 2,5 g, die Oxybuttersäure von 1,948 g (Versuch XIII), 2,732 g (Versuch XIV) und 4,316 g (Versuch XV) auf 0 bzw. 0,074 in Versuch XV. Bei geringer Acidose und starker Zuckerausscheidung nach mittleren Phlorizindosen findet sich sehr deutliche, aber bei weitem nicht so auffallende Wirkung auf die Zuckerausscheidung und noch geringere auf die Stickstoffausscheidung (Versuche XX und XXI). Bei ganz kleinen Phlorizindosen mit schwacher Glykosurie und Fehlen einer nennenswerten Acidose ist die Wirkung ganz schwach oder überhaupt nicht deutlich ausgesprochen (Versuche XXII und XXIII und Versuche XXVIII und XXVI).

Die Vorstellung, daß es sich um eine Wirkung der Säure auf das Phlorizin handeln könne, ist daher nicht haltbar. Gegen eine solche spricht ferner die Wirksamkeit der Säure beim pankreasdiabetischen Hund, Versuche, die wir nur erwähnen. Sie sollen später in anderem Zusammenhange mitgeteilt werden.

2.

Bis zu einem gewissen Grade sprechen die Resultate bei mittleren und kleinen Phlorizingaben auch gegen den zweiten Erklärungsversuch, die Wirkung der Glutarsäure durch Retention harnfähiger Substanzen zu deuten. Es würde hierbei das völlige Versagen eines Einflusses bei leichterer Störung schwer verständlich sein. Außerdem war, falls es sich um einfache Retention

[1]) Ähnliche Versuche siehe später: Versuche XXIV und XXV.

handelte, am Nachtage eine vermehrte Ausscheidung der stickstoffhaltigen Substanzen zu erwarten, da für diese Stoffe eine andere Verwertungs- oder Ausscheidungsmöglichkeit, die ja für Acetonkörper und Zucker zugegeben werden muß, nicht in Betracht kommt.

Versuch XXIV.

Gewicht des Hundes: 5500 g. 1,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	6,54	10,5	400,5	1,95	
3.	7,12	18,5	710,9	2,44	
4.	3,99	8,5	44,1	0,27	8,8 g Glutarsäure
5.	6,61	10,5	186,2	0,62	kein Phlorizin.

Versuch XXV.

Gewicht des Hundes: 12000 g (vgl. Versuch XIX). 1,3 g Phlorizin täglich.

Tag	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton mg	Oxybuttersäure g	Injizierte Substanz
2.	7,69	25,0	212,0	0,91	
3.	8,37	24,0	468,0	2,03	
4.	2,67	$< 1,5$	29,5	0,08	8,8 g Glutarsäure
5.	4,81	7,8	59,17	0,26	kein Phlorizin.

In beiden Versuchen, vor allem in Versuch XXV, in denen die Wirkung auf Stickstoff, Zucker und Acetonkörper deutlich ausgesprochen ist, ist am Nachtage von einer kompensatorischen Mehrausscheidung nichts zu erkennen. Es scheint vielmehr am Nachtage noch die Wirkung der Glutarsäure anzudauern, wenn wir die Zahlen im Versuch XXV mit denen des Versuches XIX vergleichen, die beide an demselben Tiere mit den gleichen Phlorizinmengen ausgeführt wurden. Die Ausscheidung von Stickstoff, Zucker und Aceton ist nach der Glutarsäuredarreichung auch am Nachtage erheblich verringert.

Es sind demnach keine Anhaltspunkte vorhanden, die uns gestatten, die Glutarsäurewirkung als einfache Retention aufzufassen.

3.

Es bliebe als dritte Möglichkeit ein Einfluß der Säure auf die Stoffwechselvorgänge selbst übrig.

Zur Klarlegung dieser Wirkung auf die uns ja noch unbekannten Vorgänge im intermediären Stoffwechsel wollen wir den Einfluß der Säure auf die verschiedenen in Betracht kommenden Prozesse prüfen.

Auf die Acetonkörperausscheidung wirkt die Glutarsäure ganz ähnlich wie die Zufuhr einer größeren Menge Zucker. Für manche der im vorhergehenden geprüften Substanzen, wie Alanin, Milchsäure, ist ihr Einfluß auf die Acidose wahrscheinlich durch ihre Beziehung zum Zucker zu erklären. Die gleiche Annahme kann jedoch für die Glutarsäure schon wegen des Verhaltens der Zuckerausscheidung nicht gemacht werden. Zufuhr größerer Zuckermengen beim Phlorizindiabetes bringt nämlich eine Vermehrung des Harnzuckers hervor, Zufuhr geringerer Mengen, die verbrannt werden, auf alle Fälle keine Verminderung; es zeigte in den Versuchen I bis XII von den untersuchten Substanzen keine eine nennenswerte Beeinflussung der Glykosurie. Im Gegensatz hierzu bewirkt die Glutarsäure ein starkes Herabgehen oder gar völligen Schwund der Zuckerausscheidung.

Auch die sehr starke Stickstoffretention spricht nicht zugunsten einer solchen Wirkung. Zufuhr von Zucker beim Hungertiere führt wohl zu einer N-Retention, die aber keinen solchen Wert wie in unseren Versuchen erreicht, namentlich wenn man die verhältnismäßig geringen Mengen Säure in Betracht zieht.

Die Säure mußte daher in anderer Weise wirken. Einmal konnte sie die Zuckerverbrennung selbst beeinflussen: Ihre Gegenwart führt in uns noch unbekannter Weise zur Verbrennung des Zuckers; dessen Oxydation würde dann sekundär das Schwinden der Acetonkörper zur Folge haben. Zur Erklärung der Stickstoffretention müßte man auf die oben schon erörterte Stickstoffersparnis bei Zuckerzufuhr zurückgreifen, indem die Verbrennung des im Organismus gebildeten Zuckers ähnlich beim Hunde wirkt wie von außen zugeführter.

Gegen diese Annahme spricht jedoch der Ausfall der Versuche mit mittleren und vor allem mit kleinen Phlorizingaben.

Vielmehr weist das Ergebnis dieser Versuche nach einer anderen Richtung: Volle, sichere Wirkung der Glutarsäure war in allen den Versuchen zu erkennen, in denen es sich um einen

schweren Diabetes handelte, während sie bei der leichten Form ausblieb. Die Säure scheint daher gerade auf die Vorgänge zu wirken, die beim schweren Diabetes mit dem Zuckerverlust verknüpft sind oder ihn bedingen. Beim schweren Diabetes darf eine Zuckerbildung aus Eiweiß oder aus Eiweißspaltungsprodukten als erwiesen gelten. In diesen Fällen besteht regelmäßig eine schwere Acidose. Für den Phlorizindiabetes, der mit einer Acidose einhergeht, ist dieser enge Zusammenhang zwischen Eiweißstoffwechsel und Acidose durch die Untersuchungen Baers erwiesen, indem eine Acidose nur dann zustande kommt, wenn Stickstoffdefizit vorhanden ist, also Körpereiweiß zersetzt wird.

Im Hinblick auf diese Tatsachen drängt sich die Frage auf, ob die Glutarsäure nicht gerade auf die Vorgänge wirkt, die eine Zuckerbildung aus anderem Material als vorgebildeten Kohlehydraten, also aus Eiweiß, vielleicht auch Fetten, und in inniger Verbindung damit eine Acidose zur Folge haben.

Beweise für einen solchen Einfluß ließen sich in der Tat erbringen.

Der beim phlorizinvergifteten Hungerhunde in größeren Mengen ausgeschiedene Zucker kann außer dem vorgebildeten Glykogen dem Eiweiß oder Fett entstammen. Für eine Zuckerbildung aus Fett im tierischen Organismus liegen überzeugende Tatsachen zurzeit nicht vor.

Wahrscheinlich ist es, daß auch im Hunger und bei Glykosurie dauernd eine geringe Neubildung von Glykogen stattfindet. Bei leichter Phlorizinvergiftung mit geringer Zuckerausscheidung mag das im Organismus aufgespeicherte und das ständig neugebildete Glykogen ausreichen, um die Zuckerabgabe zu bestreiten. Nach den Resultaten der Versuche mit kleinen Phlorizindosen scheint auf den letzten Prozeß die Glutarsäure keine Wirkung auszuüben. Ist dagegen die Zuckerausscheidung sehr stark, so daß Glykogenvorrat und neugebildetes Glykogen nicht ausreichen, so wird der Organismus gezwungen, anderes Material zur Bildung von Zucker heranzuziehen. Auf diese Vorgänge konnte die Glutarsäure einwirken.

Die Richtigkeit dieser Erwägung war dadurch zu erweisen, daß wir Hunde mit geringer Glykosurie, bei der sie unter gewöhnlichen Verhältnissen Reste ihres Glykogenvorrates besitzen oder noch Glykogen bilden können, durch andere Eingriffe glykogenfrei machten, also indem wir in bezug auf die Zucker-

bildung ähnliche Bedingungen herstellten, wie sonst bei starker Glykosurie.

Wir wählten hierzu das Arbeiten an der Tretmaschine; nach den Untersuchungen von Bendix[1]) gelingt es, auf diese Weise bei Tieren annähernd völligen Schwund des Glykogens zu erzielen.

Wir führten unter sonst absolut gleichen Bedingungen die Versuche an denselben Hunden mit und ohne Treten aus, so daß auf diese Weise individuelle Verschiedenheiten und andere Versuchsfehler ausgeschaltet waren.

Versuch XXVI.

Derselbe Hund wie in Versuch XX. 0,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge g	Gesamt-N g		Zucker g	Injizierte Substanz
2.	500	4,24		4,5	Vor Beginn des Versuches zwei Stunden gelaufen, sonst ruhig im Käfig
3.	400	3,98		5,0	
4. a)	320	3,20	5,70	4,8	4,4 g Glutarsäure
b)	450	2,40		< 0,5	

Am Nachtage kein Zucker.

Versuch XXVII.

Derselbe Hund. 0,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge g	Gesamt-N g		Zucker g	Injizierte Substanz
1.	800	5,82		6,43	0,2 g Phlorizin, 1¹/₂ Stunden gelaufen
2.	700	5,22		6,3	0,2 g Phlorizin, 1¹/₂ Stunden gelaufen
3.	700	5,42		7,35	0,2 g Phlorizin, 1¹/₄ Stunden gelaufen
4. a)	400	3,46	5,46	0	0,25 g Phlorizin, 35 Minuten gelaufen
b)	250	2,00		0	6,6 g Glutarsäure

Am Nachtage kein Zucker.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 479.

Versuch XXVIII.

Derselbe Hund. 0,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge g	Gesamt-N g		Zucker g		Injizierte Substanz
1.	500	5,31		6,65		0,2 g Phlorizin
2.	500	4,54		7,95		„
3.	500	5,19		10,0		„
4. a)	150	0,84		3,51		
b)	500	3,51	4,78	4,35	8,98	6,6 g Glutarsäure
c)	700 [1])	0,43		1,12		

Genau das gleiche Ergebnis ergaben analoge Versuche an einem zweiten Hunde.

Versuch XXIX.

Gewicht des Hundes: 8600 g. 0,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge g	Gesamt-N g		Zucker g		Aceton Legal	Injizierte Substanz
1.	400	3,45		9,2		—	0,2 g Phlorizin $1^1/_2$ Stunden gelaufen
2.	400	3,40		9,04		—	0,2 g Phlorizin 2 × 1 Stunde gelaufen
3.	400	3,51		9,04		+	0,2 g Phlorizin $1^1/_2$ Stunden gelaufen $1^1/_4$ „ „
4. a)	300	0,773	2,17	1,35	1,35	—	0,25 g Phlorizin $^3/_4$ Stunden gelaufen
b)	250	1,40		0		—	6,6 g Glutarsäure $^3/_4$ Std. nach dem Katheterisieren injiziert

Am Nachtage kein Zucker.

Versuch XXX.

Derselbe Hund. 0,2 g Phlorizin täglich.

Tag	Harnmenge g	Gesamt-N g	Zucker g	Aceton Legal	Injizierte Substanz
1.	510	2,86	6,5	—	
2.	500	3,81	6,55	—	
3.	500	3,87	7,5	Spur?	
4.	900	3,29	6,3	—	6,6 g Glutarsäure

[1]) Mindestens $^1/_8$ verloren gegangen. Die Urine waren stets mit Wasser aufgefüllt.

In beiden Versuchsreihen war die Glutarsäure imstande, die bei den glykogenfreien Tieren nach Phlorizindarreichung aufgetretene Glykosurie zum Schwinden oder wenigstens fast zum Schwinden zu bringen, während sie gegen ebenso starke Zuckerausscheidung bei denselben nicht glykogenfreien Tieren in gleicher Dosis sich beinahe oder ganz unwirksam erwies.

Durch diese Versuche findet das scheinbar paradoxe Verhalten der Säure bei starker und schwacher Glykosurie seine Aufklärung: Die Wirkung der Säure erstreckt sich nicht auf die Ausscheidung von vorgebildetem Zucker, sondern auf die Bildung von Zucker aus anderem Material als Kohlehydraten. Die Verhältnisse, unter denen eine solche auftritt, haben wir oben erörtert und dargelegt, daß sich unter diesen Bedingungen eine Acidose einstellt. Da es sich bei der Wirkung der Glutarsäure auf die Zuckerbildung und die Acidose wohl um den gleichen Vorgang handeln dürfte, erscheint es nach dem, was wir oben erörtert haben, wahrscheinlich, daß in diesem Fall nicht eine sekundäre Oxydation die Verbrennung der Acetonkörper bedingt, sondern daß sie verbrannt werden oder nicht entstehen, weil eine Kohlehydratbildung aus „fremdem" Material verhindert wird.

Mit diesen Darlegungen stehen die in nachfolgender Arbeit mitgeteilten Ergebnisse von Marum in Einklang. Die Leber und Muskeln von Hunden, die starke Acidose nach Phlorizinvergiftung zeigten, waren glykogenfrei, während die Organe von Tieren ohne oder ohne erhebliche Acidose noch Glykogen enthielten; es reichen also bei Acidose die Glykogenvorräte nicht aus, um die ganze Zuckerausscheidung zu erklären [1]).

Bei der Erörterung der Frage, an welchem Punkte die Wirkung der Glutarsäure einsetzt, müssen wir auf eine Frage eingehen, die wir bereits mehrfach gestreift haben. Entsteht der Zucker, der beim schweren Phlorizindiabetes zur Ausscheidung gelangt, auch normalerweise im Organismus und wird verbrannt, oder findet nach schwerer Phlorizinvergiftung Zuckerbildung in höherem Maße oder aus anderem Material als unter normalen Verhältnissen statt?

Im ersten Falle müßten wir annehmen, daß die Glutarsäure die normale Zuckerbildung hemmt, im zweiten Falle würde es sich um die Einschränkung bzw. Aufhebung eines pathologischen Vorganges handeln, eine Annahme, die wir im vorhergehenden

[1]) Vgl. Baer, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 54, 153.

mehrfach gemacht haben. Gegen die erste Auffassung scheinen uns die Versuche mit mittleren und geringen Phlorizindosen einigermaßen zu sprechen, bei denen die Wirkung der Glutarsäure schwächer ist oder ganz fehlt und sich auch nicht auf die Stickstoffausscheidung erstreckt. Besonders die extreme Stickstoffretention scheint uns im Sinne der zweiten Annahme der Aufhebung eines pathologischen Vorganges zu sprechen, wenngleich zugegeben werden muß, daß die Deutung dieser Retention als Folge einer besseren Ernährung bei stark erschöpften Tieren nicht absolut ausgeschlossen werden kann.

Jedenfalls muß aber die Glutarsäure, wie wir hier nochmals betonen, auf die Zuckerbildung aus anderem Material wirken, denn nach der Auffassung der Phlorizinglykosurie als Nierendiabetes, die jetzt als die wahrscheinlichste gelten darf, müßte der Zucker, falls er bereits gebildet wäre, zur Ausscheidung gelangen. Die Herabsetzung der Acidose würde dann durch Verbrennung der Vorstufen des Zuckers zu erklären sein, oder, was nach dem Verhalten der N-Zahlen wahrscheinlicher ist, dadurch, daß diese Vorstufen durch Zerfall von Körpersubstanz überhaupt nicht gebildet werden.

Auf die Schlüsse, die sich aus den so gewonnenen Tatsachen noch weiterhin ziehen lassen, werden wir bei der Veröffentlichung neuer experimenteller Untersuchungen, vor allem am Menschen und pankreaslosen Hunde, zurückkommen.

V.

Über die Beziehungen zwischen dem Glykogengehalt der Organe und der Acidose beim Phlorizindiabetes.

Von Dr. **Artur Marum.**

Aus der medizinischen Klinik zu Straßburg (Prof. v. Krehl).

Vermehrte Ausscheidung von Acetonkörpern tritt beim Menschen bereits nach Kohlehydratkarenz oder kurz dauerndem Hunger auf, zu einer Zeit, da sicherlich noch große Glykogenmengen in den Organen enthalten sind. Beim Hund dagegen stellt sich diese Stoffwechselstörung erst nach bedeutendem Zuckerverlust ein und zwar am sichersten bei starker Phlorizinglykosurie im Hunger. Die Frage, ob überhaupt Beziehungen zwischen Glykogenreichtum der Organe und Acidose bestehen, schien darum leichter für den Hund zu lösen als für den gegen Kohlehydratmangel so viel empfindlicheren Menschen.

Von verschiedenen Autoren wurde bei Phlorizindiabetes Glykogen in den Organen nachgewiesen. Doch wurde in diesen Versuchen nie darauf geachtet, ob zugleich eine Acidose bestand; auch die Versuchsanordnung gibt darüber keine sicheren Anhaltspunkte. Ich führe einige Beispiele aus v. Merings[1]) Versuchen an:

1. Hund von 11 kg, hungert zwei Tage, erhält dann 11 g Phlorizin per os. Am sechsten Hungertage, nachdem das Tier 390 ccm Harn mit 10,2 Proz. Zucker (= 40 g) entleert hatte, wurde es getötet. Die Leber, welche 225 g wog, enthielt 0,33 Proz., die Muskeln 0,35 Proz. Glykogen. Die Glykogenbestimmungen wurden nach der Methode von Külz ausgeführt.

2. Ein 17 kg schwerer Hund erhält nach zweitägigem Fasten 17 g Phlorizin und entleert hierauf 49 g Zucker. Am sechsten Hungertage wog die Leber 350 g und enthielt 0,045 Proz. Glykogen; der Glykogengehalt der Muskeln betrug 0,45 Proz.

---

[1]) Arch. f. klin. Medizin 14 und 16.

Külz und Wright[1]) haben zahlreiche Glykogenbestimmungen an hungernden Tieren mit Phlorizindiabetes gemacht. Als Beispiel aus ihren Versuchen sei der folgende angeführt:

Ein fünf Monate alter Hund hungert vier Tage, erhält dann 12 g Phlorizin per os. Am siebenten Hungertage erhält er abermals 12 g Phlorizin per os. Am zehnten Tage wurde er getötet. In 110 g Leber wurde 1,55 Proz. Glykogen gefunden. Die Muskulatur der linken Körperhälfte enthielt ebenfalls noch Glykogen. Der prozentische Gehalt betrug bei einer Lösung von 500 ccm 0,3563 Proz.

v. Mering gab seinen Tieren nur eine einmalige Dosis Phlorizin per os und tötete sie erst, nachdem sie noch eine Reihe von Tagen weiter gehungert hatten. Auch Külz und Wright gaben ihren Hunden Phlorizin in größeren Intervallen per os oder bisweilen auch subcutan und ließen vor deren Tode dann noch eine längere Hungerperiode folgen. Gründe, warum es auf diese Weise nicht gelingen konnte, die Tiere glykogenfrei zu machen, werden wir in unseren Versuchen noch kennen lernen. Über den Punkt, der uns hier besonders interessiert, ob bei diesen Tieren eine Acidose bestand, finden sich, wie erwähnt, bei keinem Autor Angaben. Uns erschien diese Frage von folgenden Gesichtspunkten aus wichtig: Fand sich noch ein Glykogenrest vor, so konnte der gesamte ausgeschiedene Zucker entweder aus aufgespeichertem Glykogen stammen, oder die regelmäßige Glykogen-(Zucker-)Bildung aus anderem Material, Glukoneogenie nach Cremer, war so stark, daß nicht aller Zucker infolge der Phlorizinvergiftung ausgeschieden wurde, sondern noch geringe Mengen als Glykogen zur Ablagerung kamen. Fand sich dagegen kein Glykogenrest mehr, so war die Zuckerausscheidung nicht allein auf Kosten vorgebildeten Glykogens erfolgt, sondern es war auf alle Fälle zunächt Zucker aus anderem Material gebildet worden. Es wurde hierbei aber kein Überschuß von Zucker, der als Glykogen aufgespeichert werden konnte, produziert. Wie die eben zitierten Arbeiten zeigen, ist durch die Phlorizinvergiftung an sich die Aufspeicherung von Glykogen jedenfalls nicht gehindert, wenigstens solange keine Fettleber[2]) besteht.

Baer[3]) führt die Tatsache, daß regelmäßig nur durch starke Phlorizinvergiftung eine Acidose herbeigeführt wird, bei geringen Phlorizindosen dagegen öfters fehlt, auf eine derartige relative Insuffizienz der Zuckerbildung zurück. Darnach hätten wir also

[1]) Zeitschr. f. Biologie 27 (1890).
[2]) Rosenfeld, Zeitschr. f. klin. Medizin 28 (1895).
[3]) Arch. f. experiment. Pathologie u. Pharmakologie 54.

bei Hunden mit Acidose regelmäßig Fehlen von Glykogenresten zu erwarten, bei Vergiftung ohne Acidose konnten sich dagegen noch Glykogenmengen finden, die entweder aus dem alten Glykogen, d. h. dem ursprünglich aufgespeicherten stammten, oder während des Versuches aus Zucker gebildet wurden, der über die ausgeschiedene Menge hinaus im Körper entstand.

In der Tat konnte ich in keinem Falle, in dem es zu einer starken Ausscheidung von Aceton gekommen war, auch nur Spuren von Glykogen nachweisen.

Die Versuchsanordnung war folgende:

Nachdem das Tier drei Tage gehungert hatte, erhielt es täglich bis zu seiner Tötung, die durch Schlag auf den Kopf erfolgte, subcutan eine bestimmte Menge Phlorizin in alkoholisch-wässeriger Lösung. Dann wurden sofort die Organe, Leber und Muskeln (des Oberschenkels), oft auch Nieren, genau nach den Vorschriften Pflügers[1]) auf ihren Gehalt an Glykogen untersucht. Der spontan gelassene Urin der Tiere wurde unter Toluol aufgefangen, Zucker und Aceton, häufig auch der Stickstoffgehalt quantitativ bestimmt. Von der Bestimmung der β-Oxybuttersäure wurde aus äußeren Gründen Abstand genommen.

Versuch I. Hund 6 kg, drei Tage hungernd, erhält dann drei Tage hintereinander, stets zu derselben Zeit, 0,5 g Phlorizin subcutan. In diesen drei Tagen schied er aus:

Am 1. Tage	10,15 g Zucker	0,45 g Aceton
„ 2. „	10,9 „	0,74 „
„ 3. „	14,9 „	1,19 „

Das Tier wurde am 4. Tage getötet, 50 g Leber und 50 g Muskel verarbeitet. Die Mengen wurden geteilt, so daß ich je zwei Bestimmungen zu 25 g hatte. Zum Schluß erhielt ich in allen Bestimmungen 100 ccm Lösung. Mit Fehlingscher Lösung wurde auf das Vorhandensein von Traubenzucker geprüft. Reduktion trat nicht ein.

Versuch II. Hund 16 kg, drei Tage hungernd, erhält dann vier Tage lang je 3 g Phlorizin subcutan. Er schied aus:

Am 1. Tage	18,5 g Zucker	0,14 g Aceton
„ 2. „	26,5 „	0,07 „
„ 3. „	30,9 „	0,04 „
„ 4. „	35,5 „	0,06 „

Am 5. Tage wurde er getötet, Verarbeitung der Organe wie oben. Der nach dem Tode aus der Blase entnommene Urin enthielt beträchtliche Mengen Zucker und Aceton. Es wurden 30 g Leber und 30 g Muskel zu je einer Bestimmung verwendet. Das Volum der Endlösung betrug 100 ccm; sie reduzierte nicht Fehlingsche Lösung. Hier enthielten also die Organe trotz der geringen Acetonausscheidung ebenfalls kein Glykogen.

---

[1]) E. Pflüger, Das Glykogen, Bonn 1905.

Versuch III. Hund 11 kg schwer, erhielt nach dreitägigem Hungern am 4. Tage abends 3 g Phlorizin. Am 6. Tage nochmalige Injektion von 3 g Phlorizin. Der Hund schied aus:

Am 4. Tage	8,6 g Zucker	0,18 g Aceton	3,23 g N
„ 5. u. 6. Tage	22,1 „	0,39 „	8,44 „

Am 7. Tage wurde er getötet. 50 g Muskel, 50 g Leber, 23 g Nieren wurden verarbeitet. Das Volum der Endlösungen betrug für die Leber und Muskelbestimmungen je 200 ccm, für die Nieren 150 ccm. Fehlingsche Lösung wurde nicht reduziert.

Versuch IV. Hund 6 kg schwer, erhält nach dreitägigem Hunger am Abend des 3. Tages 2 g Phlorizin. Am folgenden Tage kein Urin; er erhielt erst am Morgen des 5. Tages abermals 2 g Phlorizin, ebenso am Morgen des 6. Tages. Er schied aus:

Am 4. bis 5. Tage	21,9 g Zucker	0,11 g Aceton	8,39 g N
„ 6. „	7,23 „	0,53 „	2,9 „

Am 7. Tage wurde er getötet. 50 g Muskel, 50 g Leber verarbeitet. Die Lösungen betrugen für Leber je 250 ccm, für Muskel 300 ccm. Auch hier trat keine Reduktion der Fehlingschen Lösung ein.

Versuch V. Hund 8,7 kg, drei Tage Hunger, am 4. Tage 3 g Phlorizin subcutan, ebenso am folgenden Tage. Er schied aus:

Am 4. Tage	22,4 g Zucker	0,12 g Aceton	9,2 g N
„ 5. „	20,8 „	0,27 „	6,24 „

Am 6. Tage wurde er getötet. 50 g Muskel, 50 g Leber, 50 g Nieren wurden verarbeitet. Die Lösungen für Leber und Muskel betrugen je 200 ccm, für Niere 160 ccm. Keine Reduktion.

Ich möchte auf diesen Versuch ganz besonders hinweisen, da sich hier nach nur zweitägiger Zuckerausscheidung und Acidose die Organe bereits frei von Glykogen erwiesen.

Versuch VI. Hund 6,8 kg, drei Tage Hunger, am 4. Tage 3 g Phlorizin, ebenso an den beiden folgenden Tagen. Er schied aus:

Am 4. Tage	19,53 g Zucker	0,03 g Aceton	3,44 g N
„ 5. „	19,5 „	0,08 „	7,42 „
„ 6. „	22,9 „	0,11 „	8,79 „

Er wurde am 7. Tage getötet. Verarbeitet 50 g Muskel, 50 g Leber. Die Lösungen betrugen für Leber je 200 ccm, für Muskel je 250 ccm; keine Reduktion der Fehlingschen Lösung.

Versuch VII. Hund 10 kg schwer, drei Tage Hunger, er erhält dann drei Tage lang täglich je 3 g Phlorizin, hungert dann noch sieben Tage ohne Darreichung von Phlorizin. Zum Schluß war die Legalsche Reaktion im Urin nur noch sehr schwach. Er schied aus:

Am 4. Tage	29,54 g Zucker	0,13 g Aceton	9,13 g N
„ 5. „	18,6 „	0,18 „	6,23 „
„ 6. „	49,56 „	0,88 „	18,32 „
„ 7. „	32,12 „	0,55 „	10,04 „
„ 8. „	31,0 „	0,16 „	9,65 „

Am 9. Tage	24,5 g Zucker	0,23 g Aceton	7,37 g N
„ 10. „	Zucker nicht bestimmt	0,17 „	10,53 „
„ 11. „	24,4 g Zucker	0,12 „	8,33 „
„ 12. „	19,9 „	0,09 „	7,87 „
„ 13. „	16,62 „	0,06 „	9,36 „

Am folgenden Tage wurde das Tier getötet. 50 g Muskel, 50 g Leber, 19 g Niere wurden verarbeitet. Das Volum der Endlösungen betrug für Leber, eine Glykogenbestimmung im Muskel und in der Niere 150 ccm, für die andere Bestimmung im Muskel nur 100 ccm. Reduktion fehlte in allen Proben. In diesem Versuche trat trotz des Nachlassens der Acidose keine Neubildung von Glykogen in dem Organismus des Tieres ein, allerdings bestand noch zum Schluß eine beträchtliche Zuckerausscheidung, auch die Acetonmengen waren noch nicht vollständig zur Norm zurückgekehrt.

Versuch VIII. Hund, 7 kg schwer, drei Tage Hunger; je 2 g Phlorizin während drei Tagen, weitere drei Tage Hunger, bis keine Legalsche Reaktion mehr im Urin vorhanden ist. Er schied aus:

Am 4. Tage	42,6 g Zucker	0,16 g Aceton	15,1 g N
„ 5. „	23,75 „	0,21 „	8,18 „
„ 6. „	19,56 „	0,25 „	6,88 „
„ 7. „	19,25 „	0,20 „	6,49 „
„ 8. „	13,95 „	0,05 „	4,61 „
„ 9. „	0,76 „	0,01 „	4,35 „

Am 10. Tage wurde der Hund getötet. In der Blase fand sich etwas Urin, der schwache Reduktion nach Trommer und Nylander ergab. Kein Legal. 50 g Leber, 50 g Muskel, 16 g Niere wurden verarbeitet. Das Lösungsvolum für die Leber- und eine Muskelbestimmung betrugen 250 ccm, für die andere Muskelbestimmung 300 ccm, für die Niere 150 ccm. Die Lösungen aus Muskel und Niere (schwach sauer), auf 100 ccm eingedampft, ergaben keine Reduktion. Die Leber reduzierte deutlich Fehlingsche Lösung; stärkere Reduktion nach Eindampfen auf 62 ccm.

Dieser Versuch zeigt, daß im hungernden Organismus nach Schwinden der Acidose und einer stärkeren Zuckerausscheidung Glykogen neugebildet werden kann, wie Cremer[1]) bereits annahm. Denn um Restglykogen konnte es sich nach den vorhergehenden Versuchen nicht handeln, da vor der letzten Hungerperiode eine starke Zuckerausscheidung mit Acidose bestanden hatte, somit das Tier zu dieser Zeit vollkommen glykogenfrei war.

In einigen Versuchen wurden hungernden Hunden geringe Mengen Phlorizin gegeben, so daß zwar Glykosurie, jedoch keine durch Legalsche Reaktion wahrnehmbare Acetonurie eintrat. In diesen Fällen konnten immer, wenn auch nur geringe, Mengen von Glykogen nachgewiesen werden. (Eine Ausnahme bildet vielleicht nur Versuch II). Es kommt hier nicht zu einer so intensiven Störung durch die Glykosurie, daß aller im Organismus als Glykogen aufgespeicherte und auch der intermediär gebildete Zucker sofort

[1]) Cremer in Asher und Spiro, Ergebnisse der Physiologie 1.

vollständig ausgeschieden wird, wie beim Phlorizindiabetes mit starker Acidose.

Versuch IX. Hund, 6 kg schwer, drei Tage Hunger, dann vier Tage 0,5 g Phlorizin, N-Bestimmungen wurden hier nicht gemacht. Der Hund schied aus:

Am 4. bis 5. Tage	. . . . . .	39,25 g	Zucker	0,01 g Aceton
„ 6. „	. . . . . .	15,55	„	0,02 „
„ 7. „	. . . . . .	12,15	„	0,01 „

Am 8. Tage wurde er getötet. In der Blase fand sich etwas zuckerhaltiger Urin, der keine Legalsche Reaktion ergab. 50 g Leber, 50 g Muskeln, 22½ g Nieren wurden verarbeitet. Schließlich erhaltene Lösungen: für Leber, Muskeln und Nieren 100 ccm. Die Lösung aus Leber und Muskeln reduzierte Fehlingsche Lösung. Polarimetrisch war die Menge des Zuckers nicht festzustellen. Mit Knappscher Lösung titriert ergab sich ein Gehalt von weniger als $^1/_{10}$ Prom.

Versuch X. Hund 8 kg, drei Tage Hunger, dann vier Tage 0,5 g Phlorizin. Da die Legalsche Reaktion stets negativ ausfiel, wurden keine quantitativen Acetonbestimmungen gemacht (bis auf eine zur Kontrolle). Es wurden ausgeschieden:

Am 4. Tage	7,05 g	Zucker	5,96 g N	
„ 5. „ kein Urin				
„ 5./6. „	10,5	„	5,15 „	
„ 7. „	11,37	„	4,44 „	(0,03 g Aceton)

Am 7. Tage wurde der Hund getötet. Verarbeitet wurden 50 g Leber, 50 g Muskeln. Erhaltene Lösungen: Muskeln je 400 ccm, Leber 350 ccm. Die Muskelauszüge auf 50 ccm eingedampft ergaben keine Reduktion; die Leberlösung zeigte eine rötliche Trübung der Fehlingschen Lösung, quantitativ war jedoch die Menge Zucker nicht bestimmbar.

Es ist also gelungen, durch große Phlorizindosen, die eine starke Acidose mit beträchtlicher Zuckerausscheidung beim Hungertiere hervorrufen, das Tier in kurzer Zeit glykogenfrei zu machen. Für die Beurteilung des Glykogenbestandes bildet unter diesen Umständen der Ausfall der Legalschen Reaktion im Harn einen guten Indikator. Fällt sie stark aus, so ist das Tier glykogenfrei, im anderen Fall können sich noch Reste von Glykogen finden.

VI.

Abbau und Konstitution des Histidins.

Von **Franz Knoop.**

Aus der medizinischen Abteilung des chemischen Universitätslaboratoriums zu Freiburg i. B.

Durch den Nachweis der Identität einer synthetischen Imidazolpropionsäure mit einem Reduktionsprodukt des Oxydesaminohistidins glaubten Windaus und ich die Frage nach der Konstitution des Histidins bis auf die Stellung der Aminogruppe erledigt zu haben[1]. Das Zwingende unserer Beweisführung scheint indessen nicht überall erkannt zu sein, und das mag in der Abgelegenheit des ganzen, wenig bearbeiteten Gebietes der Imidazolchemie seinen Grund haben. So glaubte Fränkel[2] eine Anzahl von Gründen anführen zu können, die gegen die von uns bewiesene Formel sprechen sollten. Wenn wir die von ihm vorgebrachten Bedenken nun auch sämtlich als gegenstandslos haben abweisen können[3], so war doch jedem weiteren Einwande am einfachsten dadurch zu begegnen, daß durch Abbau des Histidins weitere Anhaltspunkte für seinen Imidazolcharakter beschafft wurden. Es hätte ja möglicherweise bei unserer Verarbeitung des Histidins unter den gewählten Bedingungen (konzentrierter Jodwasserstoff bei 150° im Rohr) eine Umlagerung des Histidinkernsystems eintreten, oder bei der Synthese der Imidazolpropionsäure ein Ringschluß atypisch erfolgen können, zwei Einwände, die weder von uns noch auch von Fränkel diskutiert worden sind. Vielleicht hat aber Hammarsten an solche Möglichkeiten gedacht,

---

[1]) Diese Beiträge 7, 143 (1905).
[2]) Ebenda 8, 156 (1906).
[3]) Ebenda 8, 407 (1906).

als er in der neuen Auflage seines Lehrbuches[1]) unsere Beweisführung als durch die Fränkelsche Arbeit erschüttert bezeichnete.

Der erste Einwand erledigt sich dadurch, daß Fränkel unter weniger eingreifenden Bedingungen einen Körper darstellen konnte, der sich bei unserer Nachprüfung als die gleiche, nur ungenügend gereinigte Imidazolpropionsäure erkennen ließ. Fränkel hatte dabei mit Salzsäure und Alkalinitrit eine Chlorhistincarbonsäure gewonnen, in der er durch Kochen mit Zinkstaub und Wasser das Chloratom durch Wasserstoff ersetzte. — Für die Imidazolnatur des identischen synthetischen Produktes sprach das ganze Verhalten der Substanz; ein spezieller Beweis wurde nicht erbracht, da gar kein Grund vorlag, an dem normalen Verlaufe der Imidazolsynthese in diesem Falle zu zweifeln.

Die nachfolgenden Versuche haben nun in einwandfreier Weise die Konstitution des Histidins als die eines Imidazolalanins dargetan. Es gelang nacheinander ein, zwei und drei Kohlenstoffatome abzubauen und so schließlich freies Imidazol aus dem Histidin darzustellen.

Bei diesen Operationen, die sämtlich am Oxydesaminohistidin angestellt wurden, bedurfte es zunächst vieler Versuche, bis ein geeignetes Oxydationsreagens ausfindig gemacht war. Alkalische Oxydationsmittel greifen leicht den Kern an, Permanganat und Wasserstoffsuperoxyd sprengen den Ring, Halogene wie Bromlauge substituieren ihn. In saurer Lösung dagegen greift Wasserstoffsuperoxyd gar nicht an, während Permanganat z. B. aus Methylimidazol in schwefelsaurer Lösung schon in der Kälte Essigsäure und Ammoniak abspaltet, also den Kern zerstört. Zwanzigstündiges Kochen mit überschüssigem Bleisuperoxyd und Schwefelsäure führte zu keinem nennenswerten Angriff; Oxydesaminohistidin konnte fast quantitativ zurückgewonnen werden, ein Befund, der mich vorübergehend an der noch unbewiesenen α-Stellung der Aminogruppe zweifeln ließ. Von sauren Oxydationsmitteln hatte bei Imidazolderivaten die Chromsäure Pinner im Laufe seiner Untersuchungen über die Konstitution des Pilocarpins gute Dienste geleistet. Hier ließen sich nach der Oxydation des Oxydesaminohistidins außer Oxalsäure nur ganz geringe Mengen einer bei 174° schmelzenden, in feinen farblosen Nadeln kristallisierenden, alkohollöslichen Substanz isolieren, die nicht zur Analyse ausreichten. Selbst Zusatz der berechneten Menge Phosphorsäure, um nach

[1]) Hammarsten, Lehrbuch d. physiol. Chemie. 6. Aufl. S. 777.

Pinner das Chrom nicht als freies Hydroxyd, sondern als Phosphat auszufällen, führte zu keinem besseren Ergebnis.

Von einer Verwendung der Salpetersäure hatte ich mich zunächst durch einen Versuch Fränkels[1]) abhalten lassen, der beim Kochen mit verdünnter Salpetersäure nur unverändertes Histidinnitrat isolieren konnte. Indes führte mich dieses Oxydationsmittel doch schließlich zum Ziel. Es gelang, in kleiner Menge eine Säure zu isolieren, die nach den Analysenzahlen, sowie nach dem Stickstoffgehalt eines Oxims Imidazolglyoxylsäure war.

Diese Säure mußte, wenn die angenommene Struktur richtig war, als α-Ketonsäure nach einer Reaktion von Hollemann[2]) mit Wasserstoffsuperoxyd in saurer Lösung die nächst niedere Säure, also eine Imidazolmonocarbonsäure liefern. Gerade bei den analogen Phenyl- und Thiophenderivaten, der Phenylglyoxylsäure und der Thienylglyoxylsäure war diese Reaktion glatt verlaufen, und da Wasserstoffsuperoxyd in saurer Lösung den Imidazolkern nicht angreift, so konnte eine quantitative Bildung der bisher unbekannten Imidazolmonocarbonsäure erwartet und zugleich als beweisend für die Konstitution der Imidazolglyoxylsäure betrachtet werden. In der Tat verlief die Reaktion auch hier quantitativ, und die erhaltene Säure erwies sich überdies mit einer aus Weinsäure über die Dinitroweinsäure und die Imidazoldicarbonsäure synthetisch dargestellten Imidazolmonocarbonsäure als identisch. Die gleiche Säure fand sich später auch direkt in dem Salpetersäure-Oxydationsgemisch.

Nachdem auf diese Weise nacheinander zwei Kohlenstoffatome aboxydiert waren, gelang die Abspaltung des dritten durch Erhitzen der Imidazolcarbonsäure über ihren Schmelzpunkt, und so konnte aus dem Histidin schließlich freies Imidazol dargestellt werden, das alle Eigenschaften eines synthetischen, aus Glyoxal gewonnenen Produktes zeigte.

Mit diesen Ergebnissen ist also das Histidin endgültig als Imidazolderivat charakterisiert und damit zugleich eine Frage in positivem Sinne entschieden worden, die mich in Gemeinschaft mit A. Windaus diesem Arbeitsgebiete zugeführt hatte: Bilden sich bei der Einwirkung von Ammoniak auf Kohlehydrate Substanzen, deren Atomgruppierungen auch im Eiweißmolekül eine Rolle spielen?

---

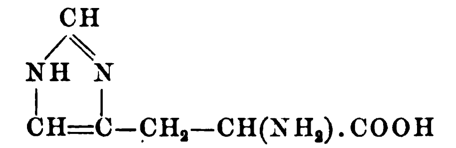
[1]) Monatshefte f. Chemie 24, 242 (1903).
[2]) Recueil des Traveaux des Pays-Bas 23, 169 (1904).

Wir konnten zunächst nachweisen[1]), daß die Entstehung von Orthodiketonen und Formaldehyd bei der Einwirkung verdünnter Alkalien auf Traubenzucker in einer ammoniakalischen Lösung zur Bildung von Imidazolderivaten führt. Nachdem nunmehr die Anwesenheit von Imidazolkörpern auch im Eiweißmolekül sichergestellt ist, gewinnt unsere Annahme, daß die im Traubenzuckerspaltungsgemisch stattfindende Kuppelung des Stickstoffs auch bei der Synthese von Eiweißkernen im Pflanzenorganismus von Bedeutung sei, an Wahrscheinlichkeit.

Ungelöst war jetzt nur noch die Frage nach der Stellung der Amidogruppe im Histidin. Wenn es gelang, durch Oxydation eine Imidazolessigsäure zu gewinnen, so war damit der Beweis erbracht, daß die Amidogruppe hier wie bei allen anderen Eiweißspaltungsprodukten in α-Stellung steht. Die Oxydation mit Salpetersäure hatte in dieser Frage kein Resultat gebracht. Zum Ziel führte erst die Verwendung von Baryumpermanganat, trotzdem es schon in der Kälte den Imidazolkern angreift.

Bringt man $Ba(MnO_4)_2$ und Schwefelsäure mit Oxydesaminohistidin zusammen, so beobachtet man, daß sich Braunstein abscheidet, solange man die Temperatur niedrig hält, daß dieser aber vollends in Lösung geht, wenn man erhitzt. Ich glaubte deshalb zunächst, mit Mangansuperoxyd allein zum Ziele zu kommen, in der Hoffnung, daß dieses den Imidazolkern nicht angreifen werde. Allein überschüssiges Mangansuperoxyd spaltet beim Kochen in schwefelsaurer Lösung aus Oxydesaminohistidin ebenfalls Ammoniak ab, und so oxydierte ich doch mit Baryumpermanganat unter Kühlung und unter Berechnung von drei Sauerstoffatomen auf ein Molekül Oxydationsmittel. Unter diesen Bedingungen wird die Seitenkette offenbar leichter oxydiert als der Kern; es ließ sich aus dem Oxydationsgemisch eine Säure isolieren, die sich durch die Analysen als die noch unbekannte Imidazolessigsäure erwies.

Mit diesem Befunde ist die Konstitution des Histidins endgültig aufgeklärt; es ist ein β-Imidazolanin



[1]) Berl. Ber. 38, 1166 (1905) und diese Beiträge 6, 392 (1905).

und zeigt in seiner Seitenkette eine bemerkenswerte Analogie zu den anderen kernhaltigen Eiweißspaltungsprodukten Phenylalanin, Paroxyphenylalanin (Tyrosin) und Indolalanin (Tryptophan).

Ich habe den hier beschriebenen Abbau des Histidins in der vorgenommenen Weise zu Ende geführt, weil es mir daran lag, die drei homologen Imidazolsäuren kennen zu lernen. Es steht zu erwarten, daß diese Körper bei der Fäulnis aus dem Histidin entstehen, genau wie sich aus dem Phenylalanin Benzoesäure, Phenylessig- und Phenylpropionsäure, aus dem Tyrosin die entsprechenden Oxysäuren bilden. Wenn diese Imidazolfettsäuren z. B. bei der Darmfäulnis entständen und resorbiert würden, so könnten sie als körperfremde Substanzen Anlaß zur Bildung analoger Fäulnisprodukte im Harn geben, wie wir sie bei den Benzolderivaten als homologe Hippursäuren, bei den Oxyphenylderivaten als gepaarte Schwefel- oder Glykuronsäuren, bei den Indolderivaten als indicangebende Substanzen kennen. Für das Auftreten derartiger Körper aus dem Gebiete der Imidazolderivate fehlt einstweilen jeder Anhaltspunkt.

Ich hoffe, bald über die Fäulnisprodukte des Histidins berichten zu können.

Experimenteller Teil.

Darstellung des Histidins.

Zur Darstellung des Ausgangsmaterials wurde bis auf kleine Modifikationen nach den Angaben von Fränkel und Pauly gearbeitet.

In große Rundkolben wurde konzentrierte Salzsäure, dann portionenweise Rinderblut gegossen, auf dem Baboblech erhitzt und nachgefüllt, bis 2 Teile Blut auf 1 Teil HCl zugegeben waren. Nach 10stündigem Kochen wurde auf dem Dampfbade viel Salzsäure abgedampft, dann bis zur schwach sauren Reaktion mit Soda neutralisiert und filtriert. Die weingelbe Flüssigkeit wurde weiter mit Soda deutlich alkalisch gemacht, gekocht bis zum Aufhören der Ammoniakentwickelung, filtriert und mit Sublimat bei anhaltend schwach sodaalkalischer Reaktion ausgefällt. Dann wurde der Niederschlag in einem Minimum von verdünnter Salzsäure gelöst, filtriert und wieder vorsichtig mit Soda, wenig Sublimat und viel Wasser gefällt, gut ausgewaschen und mit H_2S zerlegt. Aus dem Filtrat schied sich beim Einengen Histidinmonochlorid in derben, farblosen Kristallen ab, ohne daß erst, wie

Fränkel angibt, ausgeäthert oder mit Tierkohle gereinigt zu werden brauchte.

Das Kochen der alkalischen Lösung hat den Vorzug, daß man keinen Salmiak erhält. Die Auflösung des Quecksilberniederschlages trennt von dunkeln, nicht näher untersuchten Rückständen und von stets vorhandenem Kalomel, das nach der Zerlegung Salzsäure und damit ein Gemisch von Histidindichlorid und -monochlorid liefern würde. Geringe Verluste sind zweifellos mit dieser Umfällung verbunden, da der Quecksilberniederschlag sowohl in Soda wie noch besser in Kochsalzlösung löslich ist: trotzdem ist sie entschieden zu empfehlen.

Ausbeute aus 10 Liter Blut 70 bis 90 g Histidinmonochlorid.

Imidazolglyoxylsäure.

10 g Histidinchlorid werden nach Fränkel mit $AgNO_2$ in Oxydesaminohistidin übergeführt und dieses mit 10 ccm Wasser und 40 ccm HNO_3 (spez. Gew. 1,4) 6 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann wird das Gemisch so lange mit viel Wasser eingedampft, bis es annähernd salpetersäurefrei beim Stehen mit Wasser einen derben, in Wasser schwer löslichen Niederschlag ausfallen läßt; dieser wird mit Wasser gewaschen und mit Ammoniak übergossen. Dabei bleibt in kleiner Menge ein feiner, in kaltem Ammoniak unlöslicher Rückstand, der aus heißem Wasser in kleinen Drusen kristallisiert und bei 300° schmilzt. Die Menge reichte nicht zu Analysen. (Wahrscheinlich Imidazolaldehyd.) Der in Ammoniak lösliche, stark gelb gefärbte Teil wird mit Blutkohle entfärbt, gekocht, bis alles freie Ammoniak vertrieben ist und mit Eisessig, ev. unter Zusatz von Aceton, ausgefällt. Die Substanz zeigt keinen charakteristischen Schmelzpunkt; sie beginnt bei 220° sich zu bräunen und ist bei 290° völlig verkohlt. Ausbeute bestenfalls 25 Proz. der Theorie.

0,1445 g Substanz . . . . . 0,2270 g CO_2, 0,0378 g H_2O
0,1390 „ . . . . . 25,2 ccm N (18°, 729 mm).

Berechnet für $C_5H_4O_3N_2$	Gefunden
C . . . . 42,85 Proz.	42,84 Proz.
H . . . . 2,85 „	2,92 „
N . . . . 20,39 „	20,01 „

Die Säure ist in kaltem Wasser schwer, in heißem etwas leichter löslich, in Alkohol schwerer, in anderen organischen Lösungsmitteln gar nicht löslich. Das Ammonsalz löst sich nur mäßig in Wasser und scheidet sich leicht in großen Kristallbüscheln ab. Mit $CuSO_4$ gibt die Lösung des Ammonsalzes eine

kristallinische Fällung. — In Soda gelöst und mit überschüssigem Hydroxylamin versetzt, bildet die Säure ein mit Essigsäure ausfallendes Oxim, das, in Ammoniak gelöst, sich nach Zusatz von Eisessig in feinen, farblosen Nadeln abscheidet, die bei 229° scharf schmelzen.

0,1262 g Substanz . . . . . 30,0 ccm N (17°, 736 mm).

Berechnet für $C_5H_5O_3N_3$	Gefunden
N . . . . 27,15 Proz.	27,10 Proz.

Auch unverändertes Histidin liefert beim Kochen mit Salpetersäure von der angegebenen Konzentration dieses Produkt, doch erfolgt der Angriff langsamer und wird zweckmäßig durch einen geringen Zusatz von rauchender Salpetersäure eingeleitet.

Fällt man das Oxydationsgemisch nach dem Abdampfen sofort mit Alkohol und Aceton aus, so erhält man ein Gemisch von mindestens drei Substanzen, deren eine in Wasser gut löslich ist und sich als Imidazolmonocarbonsäure erweist. Setzt man beim Abdampfen der Säure die Mischung einer Temperatur aus, die nur wenig über 100° liegt, so zersetzt sich die gesamte Menge plötzlich unter Abscheidung von Kohle.

Imidazolmonocarbonsäure.

Reine Imidazolglyoxylsäure wird in viel heißem Wasser gelöst, Essigsäure zugegeben und die Lösung mit einem Überschuß von Wasserstoffsuperoxyd 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Zusatz von Blutkohle zerlegt schon in der Kälte das meiste Wasserstoffsuperoxyd, beim Abdampfen entweicht der Rest. Die filtrierte und konzentrierte Lösung wird mit Alkohol versetzt, dann scheidet sich in feinen Kristalldrusen die völlig analysenreine Imidazolmonocarbonsäure ab. Zersetzungspunkt 286°. Umkristallisieren aus Wasser und Alkohol oder Aceton.

0,1400 g Substanz . . . . . 29,9 ccm N (19°, 750 mm)
0,1564 „ . . . . . 0,2452 g CO_2, 0,0506 g H_2O.

Berechnet für $C_4H_4O_2N_2$		Gefunden
C	42,85 Proz.	42,76 Proz.
H	3,57 „	3,61 „
N	24,97 „	24,64 „

Die Säure ist leicht löslich in Wasser, unlöslich in den organischen Lösungsmitteln. Sie reagiert gegen Lackmus sauer und wird von $AgNO_3$ als gallertiger Niederschlag gefällt, nicht aber von ammoniakalischer Silberlösung. Sublimat in sodaalkalischer

Lösung fällt ebenfalls. Das Phosphorwolframat ist löslich im Überschusse und kristallisiert aus heißem Wasser in charakteristischen Rhomben.

Die Synthese der Substanz aus Weinsäure wird anderenorts beschrieben werden.

Imidazol.

Erhitzt man Imidazolcarbonsäure über 286°, so zersetzt sie sich unter Schwärzung. Zugleich entwickelt sich Kohlensäure und ein schweres Destillat, das an den Wänden des Gefäßes herabfließt und beim Kühlen zu derben Kristallblumen erstarrt. Sie werden in Chloroform gelöst und scheiden sich nach Zusatz von Ligroin in feinen langen Nadeln ab, die bei 88 bis 89° schmelzen und alle Eigenschaften eines aus Glyoxal dargestellten Imidazols zeigen, das ich der Freundlichkeit des Herrn Dr. Trautz hier verdanke. Zur speziellen Identifizierung wurde das von Bamberger und Berlé[1]), sowie von Rung und Behrend[2]) als besonders charakteristisch bezeichnete Benzoylprodukt, das Dibenzoyläthylendiamin, dargestellt, das scharf zwischen 202 und 203° schmolz.

Imidazolessigsäure.

4 g Oxydesaminohistidin wurden in 100 ccm n-Schwefelsäure gelöst, gekühlt und allmählich mit einer Lösung von 7,0 g Baryumpermanganat in 100 ccm Wasser versetzt. Anfangs entfärbt sich die Mischung langsam, später entwickelt sich CO_2 und die Entfärbung erfolgt schließlich fast momentan auch bei Eiskühlung. Es wird vom MnO_2 abfiltriert und die wasserhelle Lösung in der Hitze mit überschüssigem Baryumhydroxyd unter Zusatz von Tierkohle ausgefällt. Der Barytüberschuß wird mit H_2SO_4 genau entfernt und die Lösung eingedampft. Im Vakuum kristallisieren bald feine, fächerförmig angeordnete Nadeln, die aus Wasser und Aceton umkristallisiert werden. Schmelzpunkt 220° unter Zersetzung. Erste Ausbeute 1,1 g. Die Mutterlaugen enthalten noch andere gut kristallisierende Substanzen, die vorderhand nicht untersucht wurden.

0,1705 g Substanz verloren bei 115° 0,0215 g an Gewicht
0,1674 getrockneter Substanz: 0,2930 CO_2, 0,0706 H_2O
0,1334 „ „ 25,9 ccm N (20°, 748 mm).

[1]) Annalen 273, 353.
[2]) Ebenda 271, 30.

Berechnet für $C_5H_6N_2O_2 + H_2O$	Gefunden
H_2O . . . . 12,50 Proz.	12,60 Proz.

Berechnet für $C_5H_6N_2O_2$	Gefunden
C . . . . 47,62 Proz.	47,73 Proz.
H . . . . 4,76 „	4,71 „
N . . . . 22,27 „	22,26 „

Die Substanz ist leicht löslich in Wasser, sehr schwer in Alkohol, nicht in anderen organischen Lösungsmitteln. Sie reagiert sauer und fällt, im Gegensatz zur Imidazolmonocarbonsäure, mit $AgNO_3$ so wenig wie mit ammoniakalischer Silberlösung[1]). Das Phosphorwolframat ist löslich im Überschuß und kristallisiert aus Wasser in langen, dünnen, oft garbenartig angeordneten Nadeln. Sublimat fällt die Imidazolessigsäure wie alle ihre Homologen aus sodaalkalischer Lösung aus.

---

[1]) Vgl. hierzu diese Beiträge 8, 408.

Freiburg i. B., 22. März 1907.

Kürzere Mitteilungen.

1. Ein Benzoylpolypeptid des Asparagins.

Von Dr. **Takaoki Sasaki** (Tokio).

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Bei Gelegenheit einer Untersuchung über die Einwirkung von Benzoesäureanhydrid auf Aminosäuren habe ich beobachtet, daß es beim Erhitzen von Alanin mit Benzoesäureanhydrid auf 130° zur Bildung einer Substanz kommt, die mit Alkali und Kupfersalzlösung eine schön rote Färbung vom Typus der Biuretreaktion gibt. Auf Grund der zahlreich vorliegenden Beobachtungen über das Vorkommen der Biuretreaktion bei Polypeptiden (Grimaux, Curtius, E. Fischer) war die Vermutung berechtigt, daß es im vorliegenden Falle zum Zusammentritt von mehreren Alaninmolekülen unter Bildung eines Alanylpolypeptids gekommen sei. Ich fand bald darauf, daß Asparagin ein ähnliches Verhalten zeigt und habe mich bemüht, das entstandene Asparagylpolypeptid näher zu charakterisieren.

10 g käufliches Asparagin wurde in Form eines staubfeinen Pulvers mit der gleichen Menge Kieselgur und 50 g Benzoesäureanhydrid sehr innig gemischt und in einem Erlenmeyerkolben 5 Stunden im Glycerinbade unter Benutzung eines Thermoregulators auf 110° erhitzt. Dabei wandelt sich das Reaktionsgemenge zu einer steinharten Masse um. Nach Zerschlagen des Kolbens wird das Produkt aufs feinste gepulvert und durch 12stündige Ätherextraktion im Soxhletapparat von Benzoesäure und Benzoesäureanhydrid möglichst befreit. Der Rückstand wird nun mit viel kochendem Wasser ausgezogen, solange die Lösung Biuretreaktion aufweist und die erkaltete Lösung nach Abfiltrieren etwaiger nachträglich auftretender Niederschläge mit Ammonsulfat gesättigt. Es scheidet sich ein Niederschlag aus, der zuerst mehr flockig ist, sich dann bei erreichter Sättigung als harzartige Masse an der Oberfläche sammelt. Die Masse wird mit dem Glasstab herausgenommen, auf Tonplatten möglichst rasch von anhaftender Flüssigkeit befreit, an der Luft getrocknet, pulverisiert, in heißem Wasser gelöst und neuerlich ausgesalzen. Dieser Vorgang wird dann nochmals wiederholt, schließlich die fein gepulverte, lufttrockene Substanz mit kaltem Wasser von Ammonsulfat befreit, dann in einer kleinen Menge Aceton gelöst. Durch Zusatz von wasserfreiem Aceton kann die Lösung zweckmäßig noch von eventuell beigemengten, in Aceton schwerer löslichen Stoffen befreit werden. Nach

Abdestillieren des größten Teiles des Acetons im Vakuum und Verdunsten des Restes über Schwefelsäure bleibt das Reaktionsprodukt als feste, gut pulverisierbare Masse in einer Ausbeute von etwa 5 g zurück.

Die so erhaltene Substanz ist löslich in heißem, wenig löslich in kaltem Wasser, ziemlich leicht löslich in verdünntem Alkohol, besonders leicht aber in wasserhaltigem Aceton, fast unlöslich in absolutem Alkohol, Äther und Aceton, ganz unlöslich in Petroläther, Chloroform und Benzol. In Essigsäure und Eisessig, sowie in verdünnten Mineralsäuren, aber auch in Laugen und Ammoniak löst sie sich. Die Lösung in Wasser reagiert neutral. Die Substanz läßt sich daraus durch Sättigen mit Ammonsulfat und mit Zinksulfat aussalzen. Die Substanz ist fällbar durch Merkurinitrat, Ammoniakeisenalaun, basisches Bleiacetat und Gerbsäure (der Blei- und Gerbsäureniederschlag ist löslich im Überschuß des Fällungsmittels), ferner fällbar nach dem Ansäuren durch Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäure. Die alkalische Lösung gibt auf vorsichtigen Zusatz von Kupfersalzlösung eine prachtvolle purpur- bis violettrote Färbung.

Die in mannigfacher Art wiederholten Versuche, die Substanz zur Kristallisation zu bringen, gaben kein befriedigendes Resultat. Die Substanz hat eine Neigung, sich in mikroskopischen Kugeln oder Tropfen und daraus zusammengesetzten Häuten auszuscheiden, wie man es unter ähnlichen Verhältnissen bei den Albumosen beobachtet, wie es auch von Curtius[1]) für die Ausscheidung von einigen der von ihm dargestellten Hippurylasparaginsäurederivate und von Raper[2]) für die Phenylisocyanate der Peptone beschrieben wird.

Behufs Reinigung habe ich die Substanz in möglichst wenig wasserhaltigem Aceton gelöst, dann mit absolutem Alkoholäther gefällt, dann wieder in wasserhaltigem Aceton gelöst und nach Entfernung des größten Teiles des Acetons im Vakuum in einer Kristallisationsschale über Schwefelsäure allmählich eindunsten lassen, wobei sich ein Teil der Substanz in Form einer die Oberfläche der Flüssigkeit bedeckenden derben Haut ausschied.

Die möglichst gereinigte Substanz stellte ein blaßgelbes, nicht hygroskopisches Pulver dar, das sich bei etwa 185° aufblähte und bei 210° unter Braunfärbung zersetzte.

Die Analyse der erst im Vakuum, dann bei 80° getrockneten Substanz gab folgende Zahlen:

0,1851 g Substanz	0,3332 g CO_2,	0,0846 g H_2O
0,1514 „	23,6 ccm N (22,5°, 762,8 mm)	
0,1433 „	23,0 „ N (23,0°, 760 mm)	

	Berechnet für $C_{19}H_{24}N_6O_8$	Gefunden 1.	2.
C	49,11 Proz.	49,09 Proz.	—
H	5,21 „	5,11 „	—
N	18,12 „	17,73 „	18,16 Proz.

[1]) Journ. f. prakt. Chem. 70, 167.
[2]) Diese Beiträge 9, 168.

Auf Grund der gefundenen guten Übereinstimmung darf man annehmen, daß das entstandene Polypeptid drei Asparagingruppen auf ein Benzoyl enthält. Ob es der obigen einfachen Formel entspricht, oder einem Mehrfachen davon, ist nicht zu entscheiden. Nach Analogie ähnlicher synthetischer Produkte, besonders auch der von Curtius untersuchten Polypeptide der Hippurylasparaginsäure, darf man daran denken, daß die Bildung obiger Substanz sich in folgender Weise vollzieht:

$$C_7H_5OCl + 3\,C_4H_8N_2O_3 = C_{19}H_{24}N_6O_8 + 2\,H_2O + HCl,$$

und daß seine Konstitution — die einfachste Formel angenommen — etwa die folgende ist:

$$\begin{array}{l} C_6H_5CO.NH.\dot{C}H.CO.NH.\dot{C}H.CO.NH.\dot{C}H.COOH \\ \qquad\qquad\quad CH_2CONH_2 \quad CH_2CONH_2 \quad CH_2CONH_2 \end{array}$$

Zu dieser Auffassung stimmt meine Beobachtung, daß es nicht gelingt, mit Benzoylchlorid, Benzosulfochlorid oder Naphtalinsulfochlorid Kondensation zu erzielen.

Daß die Einwirkung von Benzoesäureanhydrid auf Asparagin zur Bildung eines Polypeptids führt, ist an sich nicht auffällig, da Säureanhydride bekannterweise neben acylierender auch eine anhydrierende Wirkung besitzen. Bemerkenswerter scheint mir, daß es gelang, durch Einhaltung bestimmter Bedingungen den Reaktionsprozeß an einem bestimmten Punkte halt machen zu lassen. Dabei scheint der Zusatz von Kieselgur eine besondere Rolle zu spielen. Wird der Versuch in gleicher Weise aber ohne Zusatz von Kieselgur durchgeführt, wobei das Reaktionsgemisch bei 110° flüssig bleibt, so ist die Ausbeute sehr gering. Hält man die Schmelze unter stetem Umrühren mittels einer Turbine 4 Stunden bei dieser Temperatur, so verschwindet die Biuretreaktion schließlich ganz. Erhitzen über 110° begünstigt die Bildung der die Biuretreaktion gebenden Substanz nicht, doch kommt es bei etwa 190° augenscheinlich zu einer neuen Reaktion mit Bildung weiterer Produkte, ohne daß jedoch Biuretreaktion auftritt.

Das Asparagin besitzt sonach, wie das Glycin und die Asparaginsäure, große Neigung zur Bildung von Peptidketten. Das oben beschriebene Produkt zeigt nun interessanterweise nicht Pepton — sondern Albumosencharakter, d. h. es läßt sich aus seinen wässerigen Lösungen aussalzen. In dem eigentümlichen Verhalten zu Alkohol, wonach es in wasserhaltigem Alkohol viel leichter löslich ist, als in Wasser allein oder in absolutem Alkohol, erinnert es direkt an Protalbumose aus Fibrin [1]). Von welchen Bedingungen die Salzfällbarkeit der Polypeptide abhängt, ist freilich im vorliegenden Falle so wenig wie bei den ähnlichen natürlichen Produkten bestimmt zu sagen. Sicher ist, daß die Molekulargröße nicht allein entscheidet. Es dürfte nicht unfruchtbar sein, diese und ähnliche Fragen an synthetischen Polypeptiden näher zu verfolgen.

Leider habe ich bisher aus äußeren Gründen meinen Untersuchungen nicht die erwünschte Vollständigkeit geben können, verzichte aber nicht darauf, diese vorläufig mitgeteilten Erfahrungen in planmäßiger Weise weiter zu verfolgen.

---

[1]) Vgl. Pick, Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 241.

2. Über das sogenannte Molkeneiweiß.

Von E. Fuld.

Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathol. Instituts zu Berlin.

Die in dem Hefte 8/11 (Bd. IX) dieser Zeitschrift erschienene Arbeit Schmidt-Nielsens (S. 322) veranlaßt mich, in aller Kürze meine den gleichen Gegenstand betreffenden Untersuchungen mitzuteilen, Untersuchungen, welche ich bereits in meiner Arbeit über den „Morgenroth-Versuch" [1]) mir vorbehalten und als im Gange befindlich erwähnt habe. Das Resultat derselben stimmt mit Schmidt-Nielsens Angaben insofern gut überein, als auch ich regelmäßig bei der Labung einer aus reinem Caseïn (Rhenania) angefertigten Lösung einen durchaus nicht ganz unerheblichen Anteil des Stickstoffs (nach Kjeldahl bestimmt) in eine lösliche, durch Essigsäure nicht fällbare Form übergehen sah. Die Caseïnlösung wurde (auf Grund einer Unterredung, die ich seinerzeit in Kassel mit Herrn Prof. Röhmann hatte) genau nach den Vorschriften Courants [2]) mittels Kalkwassers und verdünnter Phosphorsäure hergestellt, um auch nach dieser Richtung die Versuche vor Einwänden zu schützen.

Die Lösung wurde durch hineingeworfene Eisstückchen unter 10° abgekühlt, mit ebenfalls gekühltem Lab in geringem Überschuß versetzt, im Eisschrank digeriert und nach etwa 12 Stunden unter einer ganzen Reihe von Kautelen, deren Aufzählung hier nicht am Platze ist, ebenso wie die bis auf den fehlenden Labzusatz ganz gleichartig behandelte Vergleichsprobe untersucht. Das Resultat war in allen Fällen folgendes. Bereits in der Kälte war Gerinnung eingetreten. Die Molke enthielt eine Substanz von ausgesprochenem Albumosencharakter, welche mit Mineralsäuren in der Kälte einen Niederschlag gab, der sich beim Erwärmen wieder auflöste. Dieser Niederschlag enthielt etwa die Hälfte des löslichen Stickstoffs. Diese Eigenschaft der Molkenalbumose, wie ich die Substanz zu nennen vorschlage, widerspricht einigermaßen den bisherigen Beschreibungen. (Es ist wohl unnötig zu sagen, daß dieselbe weder in der labfreien Caseïnlösung noch in dem verwendeten Labpräparat, noch endlich in einer Mischung aus gekochtem Lab und Caseïnlösung auch nur in Spuren enthalten war.)

---

[1]) Biochem. Zeitschr. 1907.

[2]) Pflügers Archiv 50.

Da ich absichtlich unter Bedingungen arbeitete, welche für die Wirkung etwaiger anderer dem Lab beigemengten Enzyme, wie auch für die Pepsinwirkung und andere fermentative Spaltungen möglichst ungünstig gewählt sind, so glaube ich in der Tat vorbehaltlich einiger leicht zu beschaffenden Kontrollen über die Fermentfreiheit des verwendeten Caseïns (einschließlich des Fehlens von Profermenten usw.), daß an der Existenz einer besonderen, charakterisierten Molkenalbumose, welche weder ein Kunstprodukt noch in Lösung gebliebenes Paracaseïn sein kann, nicht mehr zu zweifeln ist.

In meinen früheren Arbeiten konnte ich mich zu dieser Annahme nicht entschließen, muß jedoch, nachdem ich mich unter, wie ich glaube, einwandfreien Bedingungen von dem Sachverhalt überzeugt habe, ebenso wie Schmidt-Nielsen und bereits vor uns P. Th. Müller an ihrer Existenz festhalten.

Ob die gegenüber Köster und Hammarstens Beschreibung etwas abweichenden Eigenschaften in der Tat, wie dies bei der Fassung des Versuchsplans erwartet wurde, auf der Hintanhaltung sekundärer Veränderungen durch die niedere Versuchstemperatur beruht, muß ebenso weiterer Untersuchung vorbehalten bleiben wie die Frage, ob die Mineralsäurenfällung geeignet ist, zwei verschiedene Spaltungsprodukte zu trennen oder, was fast wahrscheinlicher aussieht, ob dieselbe einfach unvollständig bleibt.

Über diese und noch einige weitere Punkte verweise ich auf die unmittelbar bevorstehende ausführliche Publikation in der biochemischen Zeitschrift.

Berlin, am 24. April 1907.

---

3. Zur Kenntnis des Jodothyrins.

Von A. Nürnberg.

(Vorläufige Mitteilung.)

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität Charkow.

Durch die Entdeckung von natürlich vorkommenden jodhaltigen Proteïnstoffen bzw. deren Spaltungsprodukten, ist die Aufmerksamkeit der Forscher auf die Lösung der Frage über die Bindungsweise des Jods im Eiweißmolekül gelenkt worden. Während die einen Autoren sich mit künstlicher Jodierung der Eiweißstoffe beschäftigten, die Spaltungsprodukte der erhaltenen Derivate kennen lernten, sowie in die isolierten Spaltungsprodukte der Proteïnstoffe Jod einzuführen versuchten, untersuchten die anderen die natürlichen Jodeiweißstoffe und ihre Spaltungsprodukte.

Ungeachtet einer Reihe von Arbeiten auf diesem Gebiet ist jedoch die Frage über die jodbindenden Gruppen im Eiweißmolekül nicht endgültig gelöst worden.

Auf Grund des negativen Ausfalles der Millonschen Reaktion beim Jodeiweiß hat Hofmeister[1]) als erster die Ansicht ausgesprochen, daß das Jod in das Tyrosin eintritt.

Später vermochten Blum und Vaubel[2]) nachzuweisen, daß die Millonsche Reaktion mit Diortho- und Dimetajodprodukten des Tyrosins negativ ausfällt, während die in Para-Stellung und einmal in Ortho- und Meta-Stellung substituierten Körper noch die Millonsche Reaktion geben. Denselben Autoren ist es gelungen, bei Halogeneiweißkörpern (bzw. Tyrosin) durch Wegnahme des Halogens mittels Erhitzens unter Druck die Millonsche Reaktion wieder herzustellen.

Hundeshagen[3]) konnte aus der Hornmasse verschiedener Spongien jodorganische Spaltungsprodukte in Form unlöslicher Metallsalze isolieren, die aber nicht einheitlich waren. Aus den Zersetzungsprodukten folgt, daß jodierte Aminosäuren, Jodaminofettsäuren oder Jodtyrosine vorliegen.

Drechsel[4]) stellte aus dem Gorgonin ein kristallisierbares Jodprodukt, die Jodgorgosäure dar, die er auf Grund ihrer elementaren Zusammensetzung für Jodaminobuttersäure erklärte.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 159 (1898.)

[2]) Journ. f. prakt. Chem., N. F., 57, 365 (1898).

[3]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1895, S. 475. Zit. nach Malys Jahrsber. 25, 394.

[4]) Zeitschr. f. Biologie 33, 90 (1896.)

Oswald[1]) hat durch Spalten des Jodeiweißes (aus rohem Hühnereiweiß) mit siedendem Barytwasser ein Jodprodukt dargestellt, das beim Schmelzen mit Alkali keinen Skatol- bzw. Indolgeruch entwickelte. Auf Grund der Untersuchungen der jodierten Proto- und Heteroalbumosen, die sich wenig voneinander im Jodgehalt unterschieden, während sie nach Picks Angaben im Tyrosin- und Tryptophangehalt sehr verschieden sind, kommt Oswald zur Ansicht, daß „das Jod sich nicht ausschließlich, wenn überhaupt, an das Tyrosin anlagert. Ebenso dürfte es sich nicht ausschließlich mit dem indolliefernden Komplex verankern". Später konnte Oswald[2]) diese Ansicht dadurch unterstützen, daß er die tryptischen Spaltungsprodukte des Thyreoglobulins (jodfrei) nach Entfernung des Tyrosins zu jodieren vermochte. Zum Schluß spricht er die Vermutung aus, daß vielleicht das Phenylalanin die zweite jodbindende Gruppe im Eiweißmolekül ist, und nimmt an, daß das Jod ausschließlich oder vorwiegend in den aromatischen Kern eintritt.

Henze[3]) fand, indem er die Spaltungsprodukte des Gorgonins untersuchte, daß die Drechselsche Gorgosäure eine positive Xanthoproteïnreaktion und eine negative Millonsche Reaktion gibt. Daraus schließt er, daß die Jodgorgosäure mit einer Jodaminobuttersäure nicht identisch ist und einen aromatischen Kern enthält. Ob man nach Wegnahme des Jods durch Erhitzen unter Druck einen positiven Ausfall der Millonschen Reaktion mit Gorgosäure erzielt, konnte Henze wegen Mangel am Material nicht feststellen. Schon Blum[4]) hat den negativen Ausfall der Adamkiewiczschen Reaktion mit Jodeiweiß notiert. Später ist es Rohde[5]) gelungen, die bei dieser Reaktion, sowie mit dem Ehrlichschen Paradimethylamidobenzaldehyd reagierende Atomgruppe der Eiweißkörper im Tryptophan (Skatolaminoessigsäure nach Hopkins und Cole[6]), bzw. Indolaminopropionsäure nach Ellinger[7]) zu erkennen.

Jodeiweißkörper und iodiertes Tryptophan geben, wie Rohde[8]) festgestellt hat, keine Ehrlichsche Reaktion. Er hebt die Annahme einer Jodierung der Indolgruppe im Eiweißmolekül als sehr wahrscheinlich hervor.

Wie aus den vorgeführten Literaturangaben ersichtlich ist, kommen als jodbindend im Eiweißmolekül in erster Linie die aromatischen Gruppen, namentlich jene des Tyrosins und Tryptophans, in Betracht. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, daß Jod wenigstens von zwei Gruppen im Jodeiweißkörper gebunden wird.

Ich hatte mir auf Veranlassung und unter Leitung von Professor D. Kurajeff zur Aufgabe gemacht, den Jodeiweißkörper der Schilddrüse und dessen Spaltungsprodukte näher zu untersuchen. Obwohl

---

[1]) Diese Beiträge **3**, 391.
[2]) Ebenda 514.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **38**, 360.
[4]) Ebenda **24**, 159.
[5]) Ebenda **44**, 161.
[6]) Journ. of Physiology **27**, 418.
[7]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 325.
[8]) l. c.

diese Untersuchungen zurzeit noch im Gange sind, möchte ich davon einige Versuche über die jodbindenden Gruppen im Jodthyreoglobulin vorläufig mitteilen. Ich untersuchte zwei Präparate des Jodothyrins, die nach dem Oswaldschen Verfahren [1]) aus Thyreoglobulin erhalten wurden.

Das Präparat A wurde aus 17,0 Thyreoglobulin (aus der Schilddrüse von Ochsen nach Oswald dargestellt) durch Kochen mit 10proz. Schwefelsäure und nachfolgender Extrahierung des Niederschlages mittels siedenden Alkohols dargestellt. Trotz mehrtägigem Abdampfen und Trocknen im Exsikkator über Schwefelsäure blieb das schwarzgefärbte Jodothyrin ölartig.

Ebenso wurde aus 217,0 g Thyreoglobulin das Präparat B in Form eines braungefärbten Pulvers erhalten.

Beide Präparate waren jodreich, löslich in Alkali, unlöslich in destilliertem Wasser und verdünnten Säuren, gaben negative Adamkiewiczsche, Millonsche und Ehrlichsche [2]) Reaktion und positive Xanthoproteïnreaktion.

Die Biuretprobe fiel beim Jodothyrin A negativ, beim Jodothyrin B positiv aus. Vielfach wiederholtes Spülen auf dem Filter mit destilliertem Wasser, mehrmaliges Auflösen in schwacher Natronlauge und Ausfällen mit verdünnter Salzsäure (bzw. Schwefelsäure) konnten den positiven Ausfall der Biuretprobe mit Jodothyrin B nicht beseitigen.

Die beiden beschriebenen Produkte wurden im Papinschen Kessel unter Druck erhitzt, dann wurde das Verhalten der Millonschen und Ehrlichschen Reaktion mit den erhaltenen Derivaten untersucht.

Versuch I.

Jodothyrin A in Wasser aufgerührt. Druck im Papinschen Topf 5 bis $5^1/_2$ Atmospären. Versuchsdauer eine Stunde.

Ehrlichsche und Millonsche Probe . . . . . . negativ.

Versuch II.

Jodothyrin A aus dem Versuche I. Druck $5^1/_2$ bis 6 Atmosphären. Versuchsdauer 2 Stunden 40 Minuten.

Erfolg derselbe, Flüssigkeit etwas stärker gefärbt, Niederschlag vermindert.

Versuch III.

Jodothyrin A aus dem Versuche II. Druck etwa 6 Atmosphären, Versuchsdauer 5 Stunden.

	Flüssigkeit	Niederschlag
Millonsche Probe	schwach	stark positiv
Ehrlichsche Probe	negativ	negativ
Biuretprobe	„	„

---

[1]) A. Oswald, Über die chemische Beschaffenheit und die Funktion der Schilddrüse. Habilitationsschrift. Straßburg 1900, S. 47.

[2]) Die Probe mit Dimethylamidobenzaldehyd wurde nach Rohde (l. c.) ausgeführt und der Kürze wegen in dieser Mitteilung als Ehrlichsche Reaktion genannt.

Versuch IV.

Jodothyrin A aus dem Versuche III. Jodothyrin B in Wasser aufgerührt. Druck etwa 6 Atmosphären. Versuchsdauer 5 Stunden.

Ehrlichsche Probe. Jodothyrin A: Schwach positiv bei Aufschichtung auf 1 proz. Lösung von Aldehyd in Schwefelsäure (spez. Gew. 1,84). Negativ bei üblicher Ausführungsart.

Jodothyrin B: Ausgesprochen positiv bei Aufschichtung. Bei üblicher Ausführung der Probe ergab sich ein Übergang der braunen Färbung ins Grün ohne vorläufige Violettfärbung.

Millonsche Probe ausgesprochen positiv.

Versuch V.

Versuchsmaterial aus dem Versuche IV. Druck 6 Atmosphären. Versuchsdauer $7^1/_2$ Stunden.

Ehrlichsche Probe. Jodothyrin A: Blaue Färbung bei Wasserzusatz zur grünen Flüssigkeit.

Jodothyrin B: Dasselbe. Blaue Färbung intensiver.

Millonsche Probe positiv.

Versuch VI.

Versuchsmaterial aus dem Versuche V. Druck 6 Atmosphären. Versuchsdauer 15 Stunden.

	Jodothyrin A	Jodothyrin B
Ehrlichsche Probe	negativ	negativ
Millonsche Probe	positiv	positiv

Versuch VII.

Jodothyrin B (neue Portion). Druck 6 Atmosphären. Versuchsdauer 4 Stunden.

Millonsche Probe scharf positiv. Intensität der Färbung nähert sich derselben bei Ausführung der Reaktion mit Tyrosinlösung.

Ehrlichsche Probe. Die rotviolette Färbung tritt zuerst deutlich hervor; bei weiterem Zusatz von Schwefelsäure dunkelviolette Farbe, die bei Überschuß von Schwefelsäure in Grün übergeht. Bei Wasserzusatz Übergang der grünen Farbe in eine blaue.

Aus den vorgeführten Versuchsprotokollen ist ersichtlich, daß mehrstündiges Erhitzen des Jodothyrins unter Druck von etwa 6 Atmosphären den positiven Ausfall der Millonschen Reaktion wieder hervorzurufen imstande ist. Danach erscheint die Annahme einer Jodierung des Tyrosins im Jodthyreoglobin, soweit die Spezifität der Millonschen Reaktion einen solchen Schluß gestattet, gerechtfertigt. Berücksichtigen wir die angeführten Blumschen Angaben, so muß es sich hier um Vorhandensein von Dijodtyrosin handeln.

Was das Tryptophan anbelangt, war es von Interesse klarzustellen, ob in den angeführten Versuchen der Ausfall der Ehrlichschen Probe durch die Anwesenheit von Jodiden in den untersuchten Lösungen,

durch den geringen Tryptophangehalt im Jodothyrin oder eine Veränderung des Tryptophans beim Erhitzen im Papinschen Topf beeinflußt war.

Zu diesem Zwecke wurde aus Kuhmilch Caseïn nach Hammarsten und daraus nach Hopkins u. Cole [1]) Tryptophan dargestellt.

Der Zusatz von Jodkalium beseitigte den positiven Ausfall der Ehrlichschen Reaktion weder bei Tryptophan- noch bei Eiweißlösungen.

Das Säurefiltrat aus dem Versuche VII, zur Entfernung der eventuell vorhandenen Jodwasserstoffsäure erwärmt und durch Abdampfen eingeengt, gab die Ehrlichsche Reaktion in derselben Weise, wie es oben im Versuche VII beschrieben ist.

Mit dem aus Caseïn dargestellten Tryptophan wurden folgende Versuche angestellt:

Versuch VIII.

Eine wässerige Lösung von Tryptophan wurde der Einwirkung des Jods auf dem Wasserbade bei 40° in Anwesenheit von Natriumbicarbonat unterworfen; eine andere Portion wurde unter gleichen Verhältnissen mit Ersatz des kristallinischen Jods durch Jodjodkaliumlösung behandelt. Die Jodkristalle wurden abfiltriert, das überschüssige Jod durch Chloroform entfernt.

Ehrlichsche Reaktion negativ.

Versuch IX.

Jodiertes Tryptophan (aus Versuch VIII) wurde dem fünfstündigen Drucke von 5 bis 6 Atmosphären im Papinschen Kessel unterworfen.

Ehrlichsche Reaktion. Die rotviolette Färbung ging bei weiterem Zusatz von Schwefelsäure in eine dunkelbraune über, um nach einigem Stehen grün zu werden; bei Wasserzusatz ergab sich die Blaufärbung erst nach zweistündigem Stehen.

Versuch X.

Das Tryptophan aus Caseïn wurde 6 Stunden lang einem Drucke von 5 Atmosphären im Papinschen Topf unterworfen.

Ehrlichsche Reaktion. Die rotviolette Färbung ging nach weiterem Zusatz von Schwefelsäure in eine grüne über. Blaue Färbung erschien erst nach 48stündigem Stehen der grünen Lösung.

Somit ergab es sich, daß das Verhalten des Tryptophans zum Paradimethylamidobenzaldehyd nach Bearbeitung im Papinschen Topf ähnlich ist dem von uns am dejodierten Jodothyrinpräparate beobachteten.

Zur Unterstützung dieser Ergebnisse war es von Interesse, die Entfernung des Jods noch auf anderem Wege zu erzielen. Ein derartiges Verfahren stellt der folgende Versuch dar.

---

[1]) l. c.

Versuch XI.

Indem ich die von Stepanoff[1]) unter Gulewitschs Leitung zur Wegnahme des Halogens aus dem Benzolkern ausgearbeitete Methode benutzte, verfuhr ich folgendermaßen.

0,5 g Jodothyrin B wurden in einen Erlenmeyerschen Kolben, der 30 ccm Alkohol (98 Proz.) enthielt, eingebracht; der Kolben mit einem langen, aufsteigenden Rohrkühler in Verbindung gesetzt und dann auf ein siedendes Wasserbad gebracht. Durch das Rohr des Kühlers wurde metallisches Natron stückchenweise in den Kolben derartig fallen gelassen, daß dauernd eine energische Reaktion bestand. Im ganzen wurden 6,5 g Na verbraucht. Nach Auflösen des sämtlichen Natriums wurde der Inhalt des Kolbens mit 30 ccm Wasser versetzt, der Kühler abgenommen, der Alkohol durch Eindampfen entfernt. Sämtliches Jodothyrin B war dabei gelöst. Bei Neutralisierung der Lösung schied sich ein Niederschlag aus. Das Filtrat wurde etwas durch Abdampfen eingeengt.

Millonsche Reaktion deutlich positiv.

Ehrlichsche Reaktion: rotviolette Färbung, die bei weiterem Zusatz von Schwefelsäure ins Grün überging. Die blaue Farbe wurde durch Zusatz von Wasser zur grünen Lösung erzeugt.

Beim Zusatz von unverändertem Tryptophan zum eingeengten Filtrat fiel die Ehrlichsche Probe deutlich positiv aus.

Den vorgeführten Versuchsangaben folgend, kann das Vorhandensein von jodiertem Tryptophan im Jodothyrin, soweit es die Spezifität der Reaktion mit Paradimethylamidobenzaldehyd erlaubt, als sehr wahrscheinlich angenommen werden.

Meine Untersuchungen waren schon zu Ende gebracht, als eine neue Arbeit von Henze[2]) auf diesem Gebiete erschien. Dem Autor ist es gelungen im Einklange mit Wheeler und Jamieson[3]) die Gorgosäure mit inaktivem Dijodtyrosin zu identifizieren.

---

[1]) Arbeiten aus dem medizinisch-chemischen Laboratorium der Universität Moskau. 1904/05 (Russisch).

[2]) Zur Kenntnis der jodbindenden Gruppe der natürlich vorkommenden Jodeiweißkörper. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 64.

[3]) Synthesis of gorgoic Acid. Americ. Journ. of Chem. 33, 365.

VII.

Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung.

Von Prof. Dr. **Otto v. Fürth,**
Assistenten am physiologischen Institut der Universität in Wien,
und cand. med. **Ernst Jerusalem.**

Vor einer Reihe von Jahren hat der eine von uns[1]) auf Grund von Versuchen, die in Gemeinschaft mit H. Schneider im physiologisch-chemischen Institute zu Straßburg ausgeführt worden waren, auf die Beziehungen tyrosinoxydierender Fermente (Tyrosinasen) zur Bildung melanotischer Pigmente hingewiesen. Es hat sich ergeben, daß die unter dem Namen „Melanose" bekannte Schwarzfärbung des Insektenblutes auf die Wirkung einer Tyrosinase zu beziehen ist[2]). Wurde eine (mit Hilfe fraktionierter Salzfällung aus der Körperflüssigkeit von Schmetterlingspuppen gewonnene) Fermentlösung mit Tyrosin versetzt, so schwärzte sich die Flüssigkeit nach einigem Stehen und ein schwarzes Pigment schied sich in Form von Flocken aus. Die Untersuchung dieses Pigmentes ergab (in bezug auf Löslichkeitsverhältnisse, Zusammensetzung und sonstige Eigenschaften) eine auffallende Übereinstimmung mit den natürlich vorkommenden Melaninen. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, daß die Bildung der natürlich vorkommenden melanotischen Pigmente auf die Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin oder andere leicht oxydable Substanzen aromatischer Natur zu beziehen sei.

---

[1]) O. v. Fürth und H. Schneider, Über tierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung. Aus dem physiol.-chem. Institut zu Straßburg. Diese Beiträge 1, 229 (1901).

[2]) Der erste Befund einer tierischen Tyrosinase rührt von Biedermann her (Pflügers Arch. 72, 105 [1898]), der eine solche im Darminhalte des Mehlwurmes (Tenebrio molitor) aufgefunden hatte.

Falls diese Vermutung richtig war, mußte man erwarten, in Geweben, in denen sich eine besonders lebhafte Bildung melanotischer Pigmente vollzieht, die Gegenwart von Tyrosinase nachweisen zu können. Nun besitzen bekanntlich Cephalopoden (die sogenannten „Tintenfische“) eine eigentümliche Drüse, welche große Mengen eines tintenartigen, aus Melaninkörnchen bestehenden Produktes sezerniert. Die Untersuchung der Tintendrüse mußte also sozusagen ein Experimentum crucis auf die erwähnte Hypothese abgeben. Hans Przibram[1]) vermochte nun in der Tat in den frischen Pigmentdrüsen von Sepien eine Tyrosinase nachzuweisen: Der mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellte Auszug aus den Drüsen nahm auf Zusatz von Tyrosinlösung erst eine orangerote, dann braune Färbung an und schließlich fielen schwarze Melaninflocken aus.

Diese Beobachtung Przibrams wurde später von Gessard[2]) durch den Nachweis von Tyrosinase in den käuflichen getrockneten Tintenbeuteln von Sepien bestätigt. Auch vermochte Gessard[3])[4]) eine weitere Stütze für die vorerwähnte Hypothese beizubringen, indem er in melanotischen Tumoren von Pferden nicht nur Tyrosinase, sondern auch Tyrosin und die erstere auch in der Haut dunkel pigmentierter Fische und Kröten nachwies.

Ferner haben Dewitz[5]) und Gessard[6]) festgestellt, daß bei Fliegenlarven bzw. Puppen (Lucilia Caesar) ein zeitlicher Parallelismus zwischen der Pigmentbildung in den Tegumenten und der (bei ganz jungen unpigmentierten Larven fehlenden) Eigenschaft der Körperflüssigkeit, sich bei Lichtzutritt dunkel zu färben, besteht und daß gewisse Faktoren, insbesondere Lichtabschluß (Vakuum), welche die Melanose des Blutes hindern, auch die Pigmentbildung in den lebenden Tieren hintanhalten. Auch Phisalix[7]) hat die

---

[1]) Fürth u. Schneider, l. c. S. 241.

[2]) C. Gessard, Tyrosinase animale. Compt. rend. Soc. de biol. 54, 1304 (1902).

[3]) C. Gessard, Sur deux phénomènes de coloration, dus à la tyrosinase, ibid. 57, 285.

[4]) C. Gessard, Sur la formation du pigment mélanique dans les tumeurs du cheval. Compt. rend. 138, 1086 (1903).

[5]) J. Dewitz, Untersuchungen über die Verwandlung der Insektenlarven. Arch. f. Anat. u. Physiol. 1902, S. 327. Recherches expérimentales sur la métamorphose des Insectes. Compt. rend. Soc. de biol. 54, 44. — Sur l'action des enzymes (oxydases) dans la métamorphose des Insectes, ibid., p. 45.

[6]) C. Gessard, Sur la tyrosinase dans la mouche dorée. Compt. rend. 139, 644 (1904).

[7]) C. Phisalix, Sur le changement de coloration des larves de Phyllodromia germanica. Compt. rend. Soc. de biol. 58, 17 (1905).

Pigmentierung von Larven mit der Tyrosinase in Zusammenhang gebracht.

Schließlich hat Durham[1]) es wahrscheinlich gemacht, daß auch bei der Tegumentfärbung von Säugetieren tyrosinaseartige Fermente mit im Spiele sind. In den Wasserauszügen aus der Haut von Ratten, Kaninchen und Meerschweinchen konnte die Gegenwart von Fermenten nachgewiesen werden, welche bei Anwesenheit eines Aktivators (Ferrosulfat) Tyrosin unter Bildung pigmentierter Produkte oxydierten.

Wie aus dem Mitgeteilten hervorgeht, liegt also zurzeit eine Reihe von Angaben vor, welche zugunsten der Beteiligung oxydativer Fermente an der Entstehung melanotischer Pigmente sprechen.

Es fragt sich nun aber ferner, inwieweit sich eine solche Annahme mit den über die chemische Natur der Melanine vorliegenden Angaben verträgt.

Um weitschweifige Erörterungen der außerordentlich umfangreichen Melaninliteratur zu umgehen, möge es uns gestattet sein, auf eine, diesen Gegenstand ausführlich behandelnde frühere Mitteilung des Einen[2]) von uns hinzuweisen und es dürfte an dieser Stelle genügen, nur einige der wichtigsten Punkte kurz hervorzuheben.

Die Analyse der bisher genauer untersuchten Melanine (aus Tumoren, Haaren, der Chorioidea und aus dem Tintensekrete der Sepien) ergab außerordentlich abweichende Werte (C 48,9 bis 60,0 Proz., H 3,0 bis 7,6 Proz., N 8,1 bis 13,7 Proz., S 0 bis 13,0 Proz). Bezüglich des Schwefels und des Eisens erscheint es sehr zweifelhaft, ob sie den Melaninen als solche angehören. Charakteristisch für alle Melanine ist ihre Unlöslichkeit in indifferenten Lösungsmitteln und in Säuren. Gegenüber Alkalien verhalten sich Melanine verschieden; manche sind in verdünnten Alkalien leicht löslich; andere widerstehen selbst kochenden konzentrierten Laugen. Durch schmelzende Alkalien werden Melanine in charakteristischer Weise unter Bildung saurer Produkte („Melaninsäuren") verändert. Manche Melanine werden durch Oxydations- bzw. Reduktionsmittel entfärbt. Bei Abbauversuchen durch Kalischmelze, trockene Destillation und Oxydationsmittel wurde gelegentlich das Auftreten

[1]) Fl. M. Durham, On the presence of tyrosinases in the Skins of some pigmented animals Proc. Roy. Soc. 74, 310 (Dez. 1904).

[2]) O. v. Fürth, Physiologische und chemische Untersuchungen über melanotische Pigmente. Centralbl. f. allgem. Pathol. und pathol. Anat. 15, 618—646 (1904).

von Ammoniak, Pyrrol, Pyridin, Indol, Skatol, Blausäure, einer phenolartigen Substanz, Bernsteinsäure, Oxalsäure und flüchtiger Fettsäuren beobachtet [Nenoki und Berdez[1]) Hirschfeld[2]), Abel und Davis[3]), Landolt[4]), Jones und Auer[5])].

Schließlich wären noch zwei aus neuester Zeit stammende, besonders interessante Feststellungen zu erwähnen: Ein Befund Spieglers[6]), der durch Oxydation eines Pigmentkörpers aus Haaren mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure Methyldibutylessigsäure erhielt; ferner eine Beobachtung von Wolff[7]), welcher durch Behandlung eines Pigmentes (aus einer melanotischen menschlichen Leber) mit Brom und rauchender Bromwasserstoffsäure einen hydroaromatischen, öligen, dem Xyliton $C_{12}H_{18}O$ verwandten Körper, sowie auch Isovaleronitril gewann.

Angesichts dieser so widersprechenden und vieldeutigen Befunde erschien uns im Interesse einer weiteren Aufklärung der Frage nach der Entstehung der melanotischen Pigmente im Organismus die Anstellung systematischer Versuche namentlich nach drei Richtungen hin erwünscht:

Einerseits schien es uns geboten, an der Hand eines in genügenden Mengen zugänglichen Melaninmaterials festzustellen, welche von den zahlreichen, beschriebenen Abbauprodukten als konstant, daher als für die Natur aller Melanine charakteristisch gelten können.

Andererseits ergab sich die Aufgabe, in exakterer Weise, als dies bisher geschehen war, das durch Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin entstehende künstliche Melanin zu studieren und hinsichtlich seiner Zusammensetzung und seiner Eigenschaften mit den natürlich vorkommenden Melaninen zu vergleichen.

Schließlich hofften wir (angesichts der bisher vorliegenden überaus dürftigen Angaben), die Vorgänge, die sich bei Einwirkung

[1]) Berdez und Nencki, Über die Farbstoffe melanotischer Sarkome. Arch. f. exp. Pathol. 20, 346 (1886).

[2]) Hirschfeld, Untersuchungen über den schwarzen Farbstoff der Chorioidea und verwandte Pigmente, Zeitschr. f. physiol. Chemie 13, 418 (1889).

[3]) Abel und Davis, Über die Pigmente der Negerhaut und der Haare. Journ. of exp. Medicine 1, 361 (1896).

[4]) H. Landolt, Über das Melanin der Augenhäute (aus d. physiol.-chem. Inst. Straßburg). Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 192 (1899).

[5]) Jones und Auer, On the oxydation of native pigments. Amer. Journ. of Physiol. 5, 321 (1901).

[6]) E. Spiegler, Über das Haarpigment. Diese Beiträge 4, 40 (1903).

[7]) H. Wolff, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente (aus der ersten mediz. Klinik in Berlin). Diese Beiträge 5, 476 (1904).

der Tyrosinase auf Tyrosin abspielen, auch vom Standpunkt der Fermentchemie aus durch systematische Beobachtungen und namentlich auch durch Anwendung quantitativer Untersuchungsmethoden näher studieren zu können.

Als ein relativ bequem zugängliches Melaninmaterial wählten wir den Farbstoff der melanotischen Lymphdrüsen von Pferden („Hippomelanin"), als Fermentmaterial die Pilz- und Lepidopteren-Tyrosinase.

1. Hippomelanin.

1. Literatur. Die Bezeichnung „Hippomelanin" wurde von Berdez und Nencki[1]) für den Farbstoff jener melanotischen Tumoren eingeführt, welche bei Pferden, namentlich bei Schimmeln außerordentlich häufig vorkommen und den echten melanotischen Sarkomen gegenüber durch ihren relativen benignen Charakter ausgezeichnet sind. Die genannten Untersucher und später namentlich auch K. A. H. Mörner[2]) u. a. haben mit allem Nachdruck die weitgehende Verschiedenheit des Hippomelanins vom „Phymatorhusin" oder „Sarkomelanin", i. e. dem Farbstoffe echter, maligner, metastasierender Sarkome des Menschen betont. Das letztere ist dem Hippomelanin gegenüber durch seinen Reichtum an Schwefel, seinen Eisengehalt, namentlich aber durch seine Leichtlöslichkeit in verdünnten Alkalien und seine leichtere Angreifbarkeit wohl charakterisiert.

Während das Phymatorhusin (Sarkomelanin) wiederholt genauer chemisch untersucht worden ist [außer von den genannten Forschern von Dressler[3]), Brandl und Pfeiffer[4]), Schmiedeberg[5]), Hensen und Nölke[6]) und insbesondere eingehend von Zdarek und Zeynek[7]) und v. Zumbusch[8])], liegen über das Hippomelanin nicht allzu reichliche Angaben vor.

---

[1]) l. c.

[2]) K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis von den Farbstoffen der melanotischen Geschwülste. Zeitschr. f. physiol. Chemie 11, 66 (1886).

[3]) Dressler, Untersuchung der Farbstoffe eines melanotischen Leberkrebses. Vierteljahrsschrift f. d. prakt. Heilk., Prag 88, 99 (1865).

[4]) Brandl und Pfeiffer, Beitrag zur Kenntnis der Farbstoffe melanotischer Sarkome usw. Zeitschr. f. Biol. 26, 348 (1890).

[5]) Schmiedeberg, Über die Elementarformeln einiger Eiweißkörper und über die Zusammensetzung und die Natur der Melanine. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 39, 1 (1897).

[6]) Hensen und Nölke, Ein Fall von multiplem Melanosarkom mit allgemeiner Melanose. Arch. f. klin. Med. 62, 347 (1899).

[7]) Zdarek und v. Zeynek, Zur Frage nach dem Eisengehalt des Sarkomelanins von Menschen. Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 493 (1902).

[8]) v. Zumbusch, Beiträge zur Charakterisierung des Sarkomelanins vom Menschen. Ibid., S. 511.

Dasselbe ist anscheinend zuerst von Dressler[1]) analysiert (C 46,44 Proz., H 4,22 Proz., N 10,40 bis 10,60 Proz.) und frei von Schwefel gefunden worden.

Nencki[2]), Berdez und Sieber[3]) reinigten das Pigment, das sie nach Extraktion mit Alkohol und Äther aus der mit Kalilauge von 1 Proz. zerkochten Drüse erhalten hatten, durch zwei- bis dreistündiges Kochen mit Essigsäure von 20 Proz., bzw. Salzsäure von 10 Proz. Die Analyse ergab: C 53,52 bis 53,67 Proz., H 3,84 bis 3,92 Proz., N 10,48 bis 10,87 Proz., S 2,76 bis 2,98 Proz. Nach Erhitzen auf 300° entstand bei Alkalizusatz Pyridingeruch, beim Erhitzen auf dem Platinblech Pyrrolgeruch. Aus der Lösung in konz. Salpetersäure fiel auf Wasserzusatz ein amorphes Produkt aus. Beim Schmelzen mit Kali trat eine in Alkali leicht lösliche, durch Säure fällbare Pigmentsäure von der Zusammensetzung C 59,86 bis 60,00 Proz., H 3,73 bis 3,99 Proz., N 10,41 Proz., S 2,57 bis 2,60 Proz. auf. Daneben fand sich in der Schmelze Ameisensäure neben anderen flüchtigen Säuren, Blausäure und anscheinend auch andere Nitrile, Bernsteinsäure (?), geringe Mengen einer in Äther löslichen kristallinischen, wasserlöslichen stickstofffreien, bei 187° schmelzenden Säure unbekannter Art und Schwefelwasserstoff, dagegen (im Gegensatz zum Phymatorhusin) weder Skatol, noch Indol, noch Phenol.

Schließlich hat Miura[4]) das Pigment aus melanotischer Pferdemilz nach vorausgegangener Fäulnis durch Behandlung mit Pepsin, verdünnter Natronlauge, Alkohol und Äther gereinigt und darin C 54,50 Proz., H 5,06 Proz., N 11,75 Proz. gefunden.

Ein bestimmtes Urteil über Zusammensetzung und Spaltungsprodukte läßt sich aus diesen dürftigen Angaben um so weniger gewinnen, als selbst die von Nencki und seinen Mitarbeitern angewandte Reinigungsmethode durchaus keine ausreichende Garantie für die völlige Beseitigung von schwerlöslichen Eiweißverunreinigungen bietet. Es ergab sich also die Notwendigkeit, analoge Spaltungsversuche mit einwandfreiem Material auszuführen.

2. Darstellung und Eigenschaften des Hippomelanins und der Melaninsäure. Als Ausgangsmaterial dienten im frischen Zustande aus dem Schlachthause bezogene melanotische Lymphdrüsentumoren von Schimmeln, welche von anhaftendem Gewebe befreit und bis zur Verarbeitung unter Alkohol aufbewahrt wurden.

Die zerkleinerten Tumoren wurden mit konzentrierter rauchender Salzsäure einige Stunden lang zerkocht, wobei die Pigmentkörner ungelöst blieben,

---

[1]) Dressler, Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der im Organismus vorkommenden, Melanin genannten Pigmente. Vierteljahrschrift f. d. prakt. Heilk. 101, 59 (1869).

[2]) Berdez u. Nencki, l. c.

[3]) Nencki u. Sieber, Weiterer Beitrag zur Kenntnis der tierischen Melanine. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 24, 17 (1887).

[4]) Miura, Beitrag zur Kenntnis des Melanins. Virchows Arch. 107, 250 (1887).

während die anderen Bestandteile des Gewebes vollständig in Lösung gingen. Nach Wasserzusatz wurde die Pigmentmasse auf einem gehärteten Saugfilter von der dunkel gefärbten Flüssigkeit getrennt, ausgewaschen, noch einmal mit kochender, rauchender Salzsäure extrahiert, sodann mit Wasser verrieben und ausgekocht, neuerlich abgesaugt, noch einmal der gleichen Behandlung unterzogen, sodann zweimal mit siedendem Alkohol und einmal mit Äther extrahiert und getrocknet.

Das so gewonnene Pigment bildet eine körnige, schwarzbraune Masse, die sich in allen indifferenten Lösungsmitteln, in rauchender Salzsäure und sogar auch in kochenden konzentrierten Alkalilaugen unlöslich erwies.

Die Unlöslichkeit des Hippomelanins in Alkalilaugen bot auch ausreichende Gewähr dafür, daß es nicht etwa mit sekundären Produkten der Gewebsspaltung (Melanoidinen oder Huminsubstanzen) verunreinigt war.

Zur Überführung in eine in Alkali lösliche Modifikation („Melaninsäure“) wurde das Melanin in einer großen Silberschale mit der 6- bis 10fachen Menge Ätzkali einige Stunden lang im Ölbade geschmolzen, die erkaltete Schmelze in Wasser gelöst, filtriert und die dunkle Lösung mit Säure gefällt, wobei sich der Farbstoff in dunkeln Flocken abschied. Diese wurden auf gehärtetem Filter gesammelt, gewaschen und getrocknet.

Bei Anwendung größerer Melaninmengen (es gelangten bis 100 g Pigment in einer Operation zur Verarbeitung) blieb selbst nach langdauerndem Schmelzen mit Kali ein Teil derselben nach Wasserzusatz ungelöst auf dem Filter zurück. Dieser wurde dann neuerlich mit neuen Ätzkalimengen geschmolzen und der Vorgang eventuell so lange wiederholt, bis es schließlich gelungen war, nahezu die gesamte Menge des Hippomelanins in Melaninsäure überzuführen.

Eine neutrale Lösung von melaninsaurem Alkali erschien dunkelbraun gefärbt; sie war fällbar durch Essigsäure, Salzsäure und gab mit Schwermetallsalzen (Silbernitrat, Kupfersulfat, Bleiacetat, Quecksilberacetat, Zinnchlorür usw.) dunkel gefärbte Niederschläge. Durch Erwärmen mit Wasserstoffsuperoxyd gelang es, namentlich bei Gegenwart von etwas Eisensulfat, eine teilweise Entfärbung der Lösung zu erzielen, ebenso durch Einleiten von Chlor. Beim Ansäuern fielen dann heller rötlichbraun gefärbte Niederschläge aus. Ähnliche Produkte wurden durch Einwirkung von chlorsaurem Kali und Salzsäure erhalten.

Eine Entfärbung durch Natriumamalgam, sowie durch alkalische Zinnchlorürlösung wurde nicht erzielt. Ebensowenig gelang es, eine Esterifizierung der Melaninsäure durch mehrstündiges Erhitzen derselben mit alkoholischer Salzsäure oder durch Erwärmen ihres trockenen Silbersalzes mit Jodmethyl (bei Gegenwart von Chloroform in der Druckflasche), oder

auch eine Abscheidung unlöslicher Additionsprodukte durch Schütteln der alkalischen Lösung mit Benzoylchlorid oder Benzolsulfochlorid zu bewerkstelligen.

Nach Einführung selbst großer Mengen von Melaninsäure in den tierischen Organismus (je 15 ccm einer 4 proz. Lösung von melaninsaurem Natron wurde einem Kaninchen und einem Hunde intravenös, dieselbe Menge einem Hunde intraperitoneal beigebracht) konnte weder Melanin- noch Melanogenausscheidung im Harn beobachtet werden.

3. Einwirkung der Salpetersäure auf Hippomelanin. Das Hippomelanin wird von konzentrierter Salpetersäure unter Bildung eines charakteristischen Produktes angegriffen. Nach zahlreichen Vorversuchen unter Anwendung verschiedener Kombinationen konzentrierter und rauchender Salpetersäure mit oder ohne Zusatz von konzentrierter, ev. auch SO_3-haltiger Schwefelsäure erwies sich uns nachstehendes Darstellungsverfahren als zweckmäßig:

Je 20 g Melanin wurden portionsweise mit 140 ccm eines Gemenges aus gleichen Teilen einer konzentrierten Salpetersäure und rauchender Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,52 versetzt und verrührt. Es erfolgte lebhafte Reaktion unter starker Erhitzung und Entwickelung rotbrauner Dämpfe, wobei das Melanin in Lösung ging. Die klare, rotbraune Lösung wurde in das dreifache Volumen Wasser eingegossen, wobei ein reichlicher gelblichbrauner Niederschlag ausfiel. Dieser wurde abdekantiert, auf einem gehärteten Saugfilter gesammelt, gewaschen, in Wasser verteilt und mehrere Stunden ausgekocht, der gleiche Vorgang noch zweimal wiederholt, dann die Fällung noch sehr gründlich auf dem Saugfilter mit Wasser, Alkohol, absolutem Alkohol und Äther gewaschen und schließlich im Laufe einiger Wochen im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet.

Das so in einer Ausbeute von 6 g aus 100 g Melanin erhaltene Produkt zeigte folgendes Verhalten: Es war unlöslich in Wasser, verdünnten Säuren und indifferenten, neutralen Lösungsmitteln, leicht löslich in konzentrierter Salpetersäure und verdünnten Alkalien und daraus durch Neutralisation fällbar; ferner löslich in säurehaltigem Alkohol und Aceton; in Essigäther, Äther und Chloroform war es auch bei Gegenwart von Säure kaum löslich (dagegen gelang es unter Umständen, den Farbstoff mit Hilfe alkoholhaltigen Essigäthers der mit Wasser verdünnten Reaktionsflüssigkeit der Salpetersäure auf Melanin durch Ausschütteln zu entziehen). Eine Entfärbung der alkalischen, braunroten Lösung durch Reduktionsmittel (Natriumamalgam, Zinnchlorür) gelang nicht; durch kräftige Oxydationsmittel wurde allmählich Entfärbung, jedoch unter offenbar weitgehender Verbrennung der vorhandenen organischen Substanz (Oxalsäurebildung) erzielt.

Die Analyse ergab folgende Werte:

0,2139 g Substanz gaben 0,3550 g CO_2 = 45,26 Proz. C und 0,0653 g H_2O = 3,41 Proz. H.

0,1584 g Substanz gaben 0,2631 g CO_2 = 45,33 Proz. C und 0,0506 g H_2O = 3,53 Proz. H.

0,2008 g Substanz gaben 17,7 ccm N (9°, 723 mm) = 10,13 Proz. N.

1,0295 g Substanz gaben 0,0805 g $BaSO_4$ = 1,07 Proz. S.

			Mittel	Daraus aschefrei berechnet
C	45,26 Proz.	45,33 Proz.	45,30 Proz.	47,74 Proz.
H	3,41 „	3,53 „	3,47 „	3,65 „
N	10,13 „	— „	10,13 „	10,68 „
S	1,07 „	— „	1,07 „	1,12 „
O	— „	— „	34,93 „	36,81 „
Asche	5,10 „	— „	5,10 „	— „
			100,00 Proz.	100,00 Proz.

Ähnliche Produkte haben bereits Landolt[1]) (aus dem Melanin der Chorioidea) und Wolff[2]) (aus dem Farbstoffe eines melanotischen Tumors vom Menschen) in Händen gehabt. Letzterer fand bei Analyse seines Produktes Werte, die den unserigen nachstehen (C 46,44 Proz., H 3,44 Proz., N 12,17 Proz.) und sprach sich dahin aus, es handle sich nicht um die Aufnahme von Nitrogruppen in das Melaninmolekül, vielmehr um die Zerstörung stickstoffarmer oder -freier Gruppen durch die Wirkung der Salpetersäure, wodurch das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Stickstoff zugunsten des letzteren verschoben werde.

Wir sind insofern geneigt, dieser Ansicht Wolffs beizustimmen, als in unserem Falle der absolute Stickstoffgehalt des durch Salpetersäurewirkung erhaltenen Produktes (10,68 Proz.) sich mit dem Mittelwerte aus Nenckis Hippomelaninanalyse (10,67 Proz.) deckt und der oxydative Abbau überdies durch ein Absinken des Schwefelgehaltes (1,12 Proz.) auf nahezu ein Drittel der analogen Hippomelaninwerte (2,76 bis 2,98 Proz.) illustriert wird. Es ergibt sich also kein direkter Anhaltspunkt für die Annahme der Bildung eines Nitroproduktes. Leider war es uns infolge der Lösungsverhältnisse und der intensiven Eigenfärbung des Produktes nicht möglich, durch Anwendung einer der Methoden zur quantitativen Bestimmung von Nitrogruppen (z. B. derjenigen von Limpricht) jeden Zweifel in dieser Hinsicht zu beseitigen und wir haben uns weiterhin veranlaßt gesehen, anderen eindeutigeren Abbaumethoden (s. u.) den Vorzug zu geben.

4. Einwirkung der Kalischmelze auf Hippomelanin. Es ergab sich nunmehr zunächst die Aufgabe, festzustellen, welche von den von verschiedenen Autoren aus heterogenem Melaninmaterial unter Anwendung mannigfaltiger Abbaumethoden erhaltenen Produkten auch beim Abbau des einwandsfrei ge-

[1]) Landolt, l. c.
[2]) Wolff, l. c.

reinigten und namentlich von jeder Eiweiß- und Fettverunreinigung befreiten Melanins auftreten.

Um in dieser Hinsicht jeden Irrtum auszuschließen, wurde das für Abbauversuche nach Nenckis Vorgang bestimmte, wie oben dargestellte Melaninmaterial noch einmal durch mehrstündiges Auskochen mit konzentrierter Salzsäure, sodann durch wiederholte Behandlung mit heißem Wasser, Alkohol und Äther (Extraktion im Soxhletapparat) gereinigt.

Von dem so gewonnenen einwandsfreien Melaninpräparat wurden 15 g mit 200 g Ätzkali in einer Silberschale geschmolzen und sodann über freier Flamme vorsichtig gerade so lange erhitzt, bis eine Aufhellung der dunkeln Schmelze eintrat. Es war dabei nur schwache Ammoniakentwickelung, jedoch kein fäkulenter Geruch wahrnehmbar. Die Schmelze wurde nunmehr in Wasser gelöst und die Lösung destilliert. Dabei ging nur wenig Ammoniak, jedoch keine Spur von Indol oder Skatol über. Nunmehr wurde die Lösung mit Oxalsäure angesäuert und neuerlich destilliert. Im Destillat fand sich ziemlich viel Blausäure, und zwar nach einer quantitativen Schätzung (Wägung des Silbersalzes) etwa entsprechend $^1/_2$ Proz. des Melaningewichtes. Das Destillat, nach Beseitigung der Blausäure durch Silbersulfat neuerlich destilliert, ergab nunmehr Spuren einer sauer reagierenden, nicht nach Fettsäuren riechenden Substanz. Der oxalsäurehaltige Destillationsrückstand wurde mit Alkohol verrührt und die Salzmasse abfiltriert; der Alkohol hinterließ beim Eindunsten einen spärlichen, im warmen Wasser nur teilweise löslichen Rückstand. Die wässerige Lösung gab mit Eisenchlorid eine schöne rotviolette, auf Zusatz von ein wenig Säure oder Alkali verblassende Färbung; beim Kochen mit Millonschem Reagens trat ein intensiv rotgelbes Kolorit auf, beim Erwärmen mit Salpetersäure eine intensive Gelbfärbung (mit Übergang in Rotbraun auf Alkalizusatz); Natronlauge allein bewirkte den Eintritt einer rötlichen Färbung, Bromwasser eine in Natronlauge lösliche, beim Ansäuern wieder auftretende Fällung; ammoniakalische Silberlösung, nicht aber Fehlingsche Flüssigkeit wurde bei Erwärmen stark reduziert. Offenbar lag eine der Phenolgruppe angehörige Substanz vor, deren genauere Charakterisierung jedoch angesichts der sehr geringen Menge nicht möglich war.

Ein wesentlich anderes Bild dagegen bot die Kalischmelze, wenn dieselbe nicht über freier Flamme bis zur eintretenden Entfärbung, sondern im Ölbade bei 200 bis 230° gehalten wurde. Als

die Lösung dieser Schmelze mit Salzsäure angesäuert wurde, fiel ein reichlich dunkel gefärbter „Melaninsäure"niederschlag aus, während sich im Filtrate davon ein intensiv fäkulenter, etwa an Pferdemist erinnernder Geruch bemerkbar machte.

Das Filtrat, in dem weder Indol noch Skatol nachweisbar war, wurde mit Kalilauge alkalisch, mit Oxalsäure sodann wieder sauer gemacht, destilliert, das saure Destillat mit Natronlauge neutralisiert und eingedampft. Proben des Rückstandes gaben beim Erwärmen mit verdünnter Schwefelsäure einen buttersäureähnlichen, beim Erhitzen mit absolutem Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure einen arrakähnlichen Geruch. Eine konzentrierte wässerige Lösung des Rückstandes gab mit Eisenchlorid keine Fällung, sondern eine dunkelbraunrote Färbung und erst beim Kochen einen reichlichen braunroten Niederschlag; mit Silbernitrat einen weißen, käsigen, sich beim Erwärmen schwärzenden Niederschlag (dagegen keine Reduktion ammoniakalischer Silberlösung); mit Quecksilberchlorid erst beim Kochen Abscheidung eines weißlichen Niederschlages; mit Mercuronitrat einen voluminösen, weißen, sich beim Erwärmen schwärzenden Niederschlag; mit Bleiacet eine weiße Fällung, die beim Erwärmen teilweise eine ölige Beschaffenheit annahm. Calciumchlorid gab keine Fällung, Baryumchlorid in konzentrierter Lösung sofort, in verdünnter erst nach einiger Zeit eine auch nach Wasserzusatz beim Erwärmen nur unvollständig lösliche Fällung. Eine Abscheidung schwerlöslicher Säuren durch Salzsäure wurde nicht erhalten.

Offenbar lag ein Ameisensäure enthaltendes Gemenge flüchtiger Fettsäuren vor.

Auch hier wiederum gelang in dem nach Verjagen der Fettsäuren erhaltenen oxalsäurehaltigen Rückstande der Nachweis einer phenolartigen Substanz von dem oben beschriebenen Verhalten.

Der beim Neutralisieren der Kalischmelze ausfallende Melaninsäureniederschlag, neuerlich einige Stunden mit Ätzkali bei 200° geschmolzen, lieferte wiederum ein Fettsäuregemenge von den beschriebenen Eigenschaften.

Bei einem weiteren Versuche wurden 40 g Melanin mit 250 g Ätzkali acht Stunden lang im Ölbade geschmolzen, die wässerige Lösung der Schmelze mit Salzsäure angesäuert, der Melaninsäureniederschlag abfiltriert, das fäkulent riechende Filtrat mit Äther, die ätherische Lösung mit Natronlauge ausgeschüttelt. Es fand sich weder Indol noch Skatol, noch ein Phenol, dagegen nahm die Natronlauge reichlich flüchtige Fettsäuren auf; dieselben durch Destillation abgetrennt, neutralisierten etwa 0,5 g NaOH. Das Destillat nahm beim Stehen eine rötliche Färbung an und gab eine schöne Fichtenspanreaktion: anscheinend enthielt es eine kleine Menge von Pyrrol.

Die bei diesem Versuche erhaltene Melaninsäure, die überdies (s. u. unter 6) mit Chromsäure behandelt und noch einmal

mit Kali geschmolzen worden war, lieferte, nunmehr mit Ätzkali über freier Flamme bis zur Entfärbung der Schmelze erhitzt, reichlich Blausäure.

Im fäkulent riechenden Filtrate der letzten Melaninsäurefällung waren wiederum reichlich flüchtige Fettsäuren und Spuren der phenolartigen Substanz nachweisbar.

5. Andere Versuche tiefgreifender Hippomelaninspaltung. 10 g Hippomelanin wurden aus einer Retorte der trockenen Destillation unterworfen. In die mit Wasser gefüllten Vorlagen ging ziemlich reichlich ein farbloses, sich an der Luft gelblich färbendes, das Wasser trübendes, alkalisches Öl über, das aus der alkalisch reagierenden Flüssigkeit von Äther aufgenommen wurde. Nach Ausschütteln der gelben Ätherlösung mit stark verdünnter Salzsäure hinterließ die erstere ein Öl, das durch seine Eigenschaften (Fichtenspanreaktion, Übergang in Pyrrolrot) sich als Pyrrol erwies; die salzsäurehaltige Lösung hinterließ beim Eindunsten einen spärlichen Rückstand. Die konzentrierte Lösung desselben gab mit Kalilauge eine Trübung unter Auftreten eines penetranten Pyridingeruches. Quecksilberchlorid, Jodquecksilberkalium und Jodwismutkalium sowie Pikrinsäure gaben gleichfalls Fällungen; letztere erwies sich in der Wärme löslich und fiel beim Erkalten in Tropfenform wieder aus. Offenbar lag Pyridin oder eine demselben verwandte Substanz von basischem Charakter vor.

Genau den gleichen Verlauf zeigte eine Wiederholung des Versuches mit 5 g durch Kalischmelze aus Hippomelanin dargestellter, überdies noch mit Chromsäure behandelter Melaninsäure, sowie ein weiterer Versuch, wobei 50 g Melanin mit 35 g Zinkstaub gemischt, aus einer Eisenretorte im Wasserstoffstrome trocken destilliert wurden. Neben ziemlich viel Pyrrol fand sich in den (mit Wasser und Alkohol beschickten) Vorlagen auch hier wiederum nur eine kleine Menge Pyridin, das in diesem Falle nach Beseitigung des Pyrrols noch einmal durch Destillation gereinigt werden konnte.

Bei einem Versuche, die Kalischmelze mit der Zinkstaubdestillation zu kombinieren, indem Melanin erst mit Kali in einer Silberschale geschmolzen, die Schmelze in eine Eisenretorte übertragen, mit viel Zinkstaub gemischt im Wasserstoffstrome erhitzt wurde, konnten überhaupt keine flüchtigen Produkte in namhaften Mengen isoliert werden.

Bei einem weiteren Versuche wurden 10 g Melanin mit 100 g Ätzkali im Ölbade geschmolzen und in die Schmelze Natriumsuperoxyd in kleinen Portionen bis zur beginnenden Entfärbung eingetragen (eine in Anbetracht der unter Feuererscheinung erfolgenden heftigen Reaktion und des Herumspritzens der Schmelze nicht ungefährliche Operation). Aus der Lösung ließ sich durch Salzsäurefällung noch $1^1/_2$ g „Melaninsäure“ ge-

winnen; im Filtrate derselben fand sich von organischer Substanz nur Oxalsäure in reichlichen Mengen, also nur das Anfangs- und Endprodukt, aber kein Zwischenprodukt der Reaktion.

Um festzustellen, ob ein Produkt, ähnlich der von Spiegler[1]) aus einem Haarpigmente gewonnenen Methyldibutylessigsäure, aus Hippomelanin gewonnen werden könne, wurde, Spieglers Vorgang folgend, 20 g Melanin in 250 ccm 20proz. Chromsäurelösung (hergestellt aus Kaliumbichromat und Schwefelsäure) in kleinen Portionen unter Umrühren eingetragen; es war keine lebhafte Reaktion, sondern nur eine schwache Gasentwickelung wahrnehmbar. Nach $2^1/_2$ stündigem Erwärmen am Wasserbade wurde mit Wasser verdünnt und filtriert. Während Spiegler bei dem gleichen Vorgange unter lebhafter Reaktion und sogar auch schon in der Kälte eine Umwandlung seines Haarpigmentes in ein weißes, kristallinisches, in Eisessig, Aceton u. dgl. lösliches Produkt beobachtet hatte, blieb hier die schwarze Pigmentmasse im wesentlichen unverändert; auch gelang es nicht, ihr durch kochenden Eisessig eine hell gefärbte Substanz zu entziehen.

Die im Vergleich zu anderen Melaninen viel größere Widerstandsfähigkeit des Hippomelanins gegenüber oxydativen Agenzien offenbarte sich auch bei dem Versuche, Wolffs[2]) Vorgange folgend, Xyliton aus demselben zu gewinnen. 10 g Melanin wurden in einer Druckflasche mit 50 ccm stärkster Bromwasserstoffsäure (bei 0° gesättigt, Kahlbaum) und etwa $2^1/_2$ g Brom $1^3/_4$ Stunden auf 110 bis 118° erhitzt. Das Brom verschwand bei der Reaktion; doch blieb das Melanin äußerlich unverändert. Während Wolff bei gleicher Behandlung seines Pigmentes aus menschlicher sarkomatöser Leber reichliche Mengen eines in Äther löslichen Öles erhielt, fand sich in unserem Falle nur eine minimale Menge einer ätherlöslichen, in feinen Nädelchen kristallisierenden, stickstoffhaltigen, unzersetzt flüchtigen, in Wasser und kochender Natronlauge unlöslichen Substanz, die mit dem Xyliton keinerlei Ähnlichkeit besaß.

Der Versuch wurde noch in der Weise variiert, daß die Druckflasche im Chlorcalciumbade zwei Stunden bei 125 bis 130° gehalten wurde. Wir erhitzten ferner 4 g Melanin mit 20 ccm rauchender Bromwasserstoffsäure nnd 1 ccm Brom im Einschlußrohre zwei Stunden auf 115 bis 135°. Auch hier blieb das Pigment äußerlich unverändert und es wurden nur Spuren ätherlöslicher Substanz gebildet.

---

[1]) Spiegler, l. c.
[2]) Wolff, l. c.

Daß aber das Hippomelanin dem Brom gegenüber nicht absolut resistent ist, ergibt folgender Versuch: 20 g Melanin wurden in einer Druckflasche mit 20 ccm Brom und 20 ccm Wasser im kochenden Wasserbade einen Tag gehalten. Beim Öffnen der erkalteten Flasche zeigte es sich, daß das Brom verschwunden war. Auch weitere 20 ccm Brom verschwanden in der gleichen Weise, während eine dritte Bromportion auch nach zweitägigem Erhitzen nicht verschwunden war. Nach Beseitigung des Bromüberschusses durch Destillation fand sich die Hauptmenge des Pigmentes (etwa 15 g) ungelöst und insofern verändert, als es nunmehr in Alkali leicht löslich geworden war (Übergang in „Melaninsäure“); das Filtrat enthielt etwa $2^1/_2$ g Oxalsäure.

Also auch hier wiederum das Nebeneinander des Anfangs- und Endproduktes, das Fehlen eines Zwischenproduktes der Oxydation.

Das gleiche ergab überdies die sehr vorsichtige Oxydation von alkalischen Melaninsäurelösungen (in Portionen zu 5 g) durch allmählichen Zusatz von Permanganatlösung bzw. Bromlauge; auch hier ging mit dem Verschwinden der Melaninsäure das Auftreten von Oxalsäure einher.

6. Kombination von Kalischmelze und Chromsäureoxydation. Wir legten uns nunmehr die Frage vor, nach welcher Richtung hin die quantitative Zusammensetzung der „Melaninsäure“ verschoben werde, wenn man sie mit Chromsäure weiterbehandelt, also die labilen Anteile des großen Pigmentsäuremoleküls durch Oxydation zu beseitigen trachtet.

100 g Hippomelanin wurden so lange mit Ätzkali im Ölbade immer wieder von neuem geschmolzen, bis es schließlich gelungen war (s. o.), die ganze Pigmentmasse in Alkali löslich zu machen, also in „Melaninsäure“ überzuführen. Diese wurde mit Salzsäure gefällt, der Niederschlag ausgewaschen, in 150 ccm eines Chromsäuregemisches (50 Teile Kaliumbichromat, 50 Teile konzentrierte Schwefelsäure, 100 Teile Wasser enthaltend) suspendiert, über Nacht bei Zimmertemperatur, sodann eine Stunde am Wasserbade belassen, das ungelöste Pigment abgesaugt, mit viel Wasser ausgekocht, abgesaugt, der Vorgang noch dreimal wiederholt, das Pigment nunmehr noch einmal $^1/_2$ Tag mit Alkali geschmolzen, die Schmelze im Wasser gelöst, filtriert (wobei sich ein intensiver fäkulenter Geruch bemerkbar machte), das Filtrat mit Salzsäure gefällt, der Niederschlag auf gehärtetem Filter gesammelt, mit Wasser verrieben und ausgekocht, wieder abgesaugt, der Vorgang noch dreimal wiederholt, die Substanz einige Stunden mit Alkohol, sodann mit Äther extrahiert und bei 95° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Eine orientierende Analyse dieses Präparates ergab folgende Zusammensetzung:

0,2969 g Substanz gaben 0,6091 g CO_2 = 55,94 Proz. C und 0,0757 g H_2O = 2,82 Proz. H.

0,2834 g Substanz gaben 21 ccm N (9°, 719 mm) = 8,48 Proz.

1,0553 g Substanz gaben 0,0784 g $BaSO_4$ = 1,03 Proz. S.

0,7835 g Substanz gaben 0,0284 g Asche (chromhaltig) = 3,62 Proz.

Demnach:

		Aschefrei berechnet
C	55,94 Proz.	58,04 Proz.
H	2,55 „	2,64 „
N	8,48 „	8,79 „
S	1,03 „	1,06 „
Asche	3,62 „	—
O	28,38 „	29,47 „
	100,00 Proz.	100,00 Proz.

woraus sich, auf Stickstoff als Einheit berechnet, die Atomrelation $C_{7,7}H_{4,8}N_1S_{0,05}$ ergab.

In analoger Weise wurde noch ein anderes Präparat dargestellt, diesmal jedoch die Melaninsäure einer weit intensiveren Oxydation unterworfen, insofern auf 40 g Melanin 500 ccm 20 proz. Chromsäurelösung zur Anwendung kamen (im Vergleiche zum ersten Versuche etwa die fünffache relative Chromsäuremenge) und die Dauer der Einwirkung auf dem Wasserbade 3 Stunden betrug. Die Analyse des Präparates ergab:

0,1660 g gaben 0,3284 g CO_2 = 53,98 Proz. und 0,0450 g H_2O = 3,01 Proz. H.
0,3552 g Substanz gaben 20,8 ccm N (21°, 723 mm) = 6,46 Proz. N ⎫ 6,93 Proz. N.
0,0990 g Substanz gaben 6,6 ccm N (19°, 723 mm) = 7,40 Proz. N ⎭
0,8419 g Substanz gaben 0,0434 g $BaSO_4$ = 0,707 Proz. S.

Eisen war selbst qualitativ nicht nachweisbar.

Die Zusammensetzung betrug demnach:

C	53,98 Proz.
H	3,01 „
N	6,93 „
S	0,71 „
O + Asche[1]	35,37 „
	100,00 Proz.

woraus sich die auf Stickstoff als Einheit bezogene Atomrelation $C_{9,2}H_{6,0}N_1S_{0,04}$ berechnen ließ.

Berechnet man aus dem Mittelwerte der Hippomelaninanalyse von Berdez und Nencki[2]) (C 54,60 Proz., H 3,87 Proz., N 10,67 Proz., S 2,84 Proz.) und der Hippomelaninsäure-Analysen von Nencki und Sieber[3]) (C 59,93 Proz., H 3,88 Proz., N 10,41 Proz., S 2,59 Proz.) die Atomrelationen und vergleicht man sie mit den analogen Werten unserer Präparate:

Hippomelanin	$C_{5,9}H_{5,1}N_1S_{0,12}$
Hippomelaninsäure	$C_{6,7}H_{5,2}N_1S_{0,11}$
Niederes Oxydationsprodukt der Hippomelaninsäure	$C_{7,7}H_{4,7}N_1S_{0,05}$
Höheres Oxydationsprodukt der Hippomelaninsäure	$C_{9,2}H_{6,0}N_1S_{0,04}$

[1]) Das Präparat enthielt noch etwas Asche, deren Mengenbestimmung infolge Materialmangels leider unterblieben ist.
[2]) l. c.
[3]) l. c.

so ergibt sich, daß in dem Maße als der Abbau fortschreitet, das resultierende Produkt neben der Verarmung an Schwefel eine sehr auffällige Verschiebung des Verhältnisses des Kohlenstoffs zum Stickstoff zugunsten des ersteren aufweist. Eine weitere Erörterung der sich aus diesen, sowie aus den vorausgehenden Versuchen ergebenden Folgerungen soll erst zum Schlusse, nach Mitteilung der das künstliche Melanin betreffenden Beobachtungen Platz finden.

2. Fermentative Melaninbildung.

A. Pflanzliche Tyrosinase.

1. Literatur über Pilztyrosinasen. Da die zunächst mitzuteilenden Untersuchungeu über fermentative Melaninbildung mit Hilfe von aus Pilzen gewonnener Tyrosinase ausgeführt worden sind, möge es uns gestattet sein, die wichtigsten über pflanzliche Tyrosinasen bisher vorliegenden Beobachtungen hier in Kürze anzuführen.

Die Untersuchungen von G. Bertrand[1]) und Bourquelot[2]) haben gelehrt, daß die Dunkelfärbung von Pilzen beim Absterben auf die Einwirkung oxydativer Fermente auf aromatische Substanzen zu beziehen ist und zwar wurde die (Guajakharz und Hydrochinon oxydierende) „Lakkase“ von der Tyrosin oxydierenden „Tyrosinase“ unterschieden. Die Tyrosinase fand sich in unregelmäßiger Verbreitung bei zahlreichen Pilzen; bei anderen wurde sie vermißt. Auch in manchen chlorophyllführenden Pflanzen wurde sie angetroffen; so in roten Rüben (deren Saft sie nachdunkeln macht; vgl. Gonnermann[3]) und Dahlien. Das Studium der Tyrosinase war durch die Labilität derselben sehr erschwert; doch gelang es

---

[1]) Bourquelot et Bertrand, Le bleuissement et le noircissement des champignons. Compt. rend. Soc. de biol. 47, 582 (1895). — Bertrand, Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale. Compt. rend. 122, 1215 (1896). — Derselbe, Sur la présence simultanée de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons, ibid. 123, 463 (1896).

[2]) Bourquelot, Les ferment oxydants dans les champignons. Compt. rend. Soc. de biol. 58, 811 (1896); Sur quelqes propriétés des solutions aqueuses chloroformées du ferment oxydant des champignons et sur la durée de l'activité de ces solutions, ibid. p. 893. — Sur la durée de l'activité des ferments oxydants des champignons en solution dans la glycérine, ibid. 49, 454 (1897).

[3]) Gonnermann, Homogentisinsäure, ein Bestandteil der Rüben usw. Pflügers Arch. 82, 289.

immerhin, beim Trocknen der Schwämme im Vakuum, sowie bei Extraktion mit Chloroformwasser bzw. Glycerin die Tyrosinase auch längere Zeit zu konservieren. Durch Fällen der Extrakte mit Alkohol und wiederholtes Lösen und Wiederfällen der Niederschläge wurden reinere, wirksame Lösungen erhalten.

Gessard[1]) sah bei Einwirkung von Tyrosinase auf Tyrosin zunächst eine Rotfärbung und dann erst eine Schwärzung und Abscheidung dunkler Flocken auftreten, welche letztere durch Aufkochen, Schütteln mit Kreide, Zusatz von Salzen, alkalischen Erden und dergleichen beschleunigt wurde. Bei 0° verlief die Reaktion sehr langsam; sie hatte ihr Optimum bei 45 bis 50°; bei 68° erfolgte eine langsame Zerstörung der Tyrosinase. Schwache Säuregrade und Ferrosalze wirkten fördernd, geringe Mengen von Alkalien, ferner Alkali- und Erdalkalisalze sowie Eiweißkörper hemmend auf die Reaktion. Durch Immunisierung mit Tyrosinase wurde „Antityrosinase" erhalten.

Endlich hat Bach[2]) kürzlich die Beschleunigung der Tyrosinasereaktion durch Wasserstoffsuperoxyd, sowie die Spezifizität derselben betont, insofern z. B. Peroxydase aus Meerrettich auch bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd Tyrosin unter keinen Umständen zu oxydieren vermag.

2. Gewinnung der Tyrosinase. Wie aus dem Mitgeteilten hervorgeht, sind die vom Standpunkte der Fermentchemie über die Tyrosinase gesammelten Erfahrungen sehr dürftiger Natur und namentlich fehlt bisher jede Bemühung, die Wirkung der Tyrosinase durch quantitative Versuche messend zu verfolgen.

Die Mehrzahl unserer Versuche sind mit Fermentlösungen aus Agaricus melleus (Halimasch) und Agaricus campestris (Champignon) ausgeführt worden. Wir fanden die Tyrosinase reichlich auch in anderen Pilzarten, die wir der Freundlichkeit des Herrn Professor Wettstein R. v. Westersheim, Direktors des botanischen Institutes in Wien, verdankten — so in Agaricus fascicularis, procerus, bulbosus, in verschiedenen Russulaarten — nicht aber in Proben der Gattungen Clavaria und Lycoperdon, und ebensowenig im Steinpilz (Boletus edulis); doch mußten wir uns aus äußeren Gründen, da wir mit unseren einschlägigen Versuchen

[1]) Gessard, Étude sur la tyrosinase. Ann. Inst. Pasteur 15, 593 (1901); vgl. auch Compt. rend. Soc. de biol. 54, 551 und Compt. rend. 138, 777.

[2]) Bach, Peroxydasen als spezifisch wirkende Enzyme. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 39, 2126, Juni 1906.

erst im Spätherbst begonnen haben, auf die beiden erstgenannten Gattungen beschränken, die uns zu dieser Jahreszeit noch in größeren Mengen zugänglich waren. (Der Halimasch kommt in Wien im Spätherbst in großen Mengen auf den Markt; der künstlich gezüchtete, allerdings recht kostspielige Champignon ist während des ganzen Winters erhältlich.) Das günstigste Objekt für Tyrosinasegewinnung scheinen übrigens Russulaarten zu bilden, welche auch von den vorerwähnten französischen Forschern zu diesem Zwecke in erster Linie verwendet worden sind. Zur Gewinnung der Tyrosinase gingen wir zumeist nach den Prinzipien Bertrands[1]) und seiner Mitarbeiter vor. Am zweckmäßigsten erwies sich uns folgende Methode:

Je 2 kg der Schwämme (Agaricus melleus) wurden fein zerhackt, mit Sand verrieben, hierauf mit 2 Liter Chloroformwasser durchgerührt. Nach 2 bis 3 Stunden wurde die Flüssigkeit abkoliert, mit dem zweifachen Volumen Alkohol von 96 Proz. versetzt, der sich nach einigem Umrühren sehr schnell absetzende fädige Niederschlag sofort durch Rohseide abgesaugt und entweder im Vakuum getrocknet oder aber sogleich mit 100 ccm Chloroformwasser verrieben. Die am nächsten Tage abfiltrierte fermenthaltige Flüssigkeit wurde in der Regel sogleich verwendet, da sie sich als wenig haltbar erwies.

Da die Tyrosinase von Alkohol sehr schnell geschädigt wird, kommt es vor allem darauf an, die Berührung desselben mit den fermenthaltigen Niederschlägen nach Möglichkeit abzukürzen. Der Champignon lieferte uns stets eine ziemlich schlechte Fermentausbeute; vermutlich, weil die Alkoholfällungen in den Extrakten sich hier schlecht absetzten und die Filtration daher viel längere Zeit in Anspruch nahm. Die Empfindlichkeit der Tyrosinase dem Alkohol gegenüber ist wohl auch die Ursache des Fehlschlagens aller Versuche, die Tyrosinase nach dem von Bach und Chodat[2]) für Peroxydasen angegebenen Verfahren (Extraktion mit Alkohol 40 Proz., Einengen im Vakuum, Fällung mit absolutem Alkohol) zu isolieren.

Während die frischen Pilzextrakte reich an Katalase (Wasserstoffsuperoxyd zersetzendem Fermente) sind, erwiesen sich die durch Chloroformwasserextraktion aus den getrockneten Präparaten erhaltenen tyrosinasehaltigen Lösungen als frei von Katalase. (Der Nachweis wurde in einer mit mehrfach gebohrten Gashähnen versehenen und entsprechend adjustierten gasometrischen Bürette ge-

---

[1]) Bertrand, l. c.

[2]) Bach und Chodat, Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle; IV. Peroxydase. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 36, 1, 600.

führt, welche das Gemenge von Fermentlösung, Wasserstoffsuperoxyd und Wasser aufnahm und die direkte Messung der entwickelten Sauerstoffmenge gestattete.)

3. Untersuchungsmethode. Wurde eine fermenthaltige Flüssigkeit mit Tyrosinlösung (wir verwendeten meist eine solche, welche 0,05 Proz. Tyrosin und 0,04 Proz. Natriumcarbonat enthielt) und etwa überdies mit einer geringen Menge Wasserstoffsuperoxyd versetzt, so beobachtete man das Auftreten einer erst rötlichgelben, dann bräunlichroten, schwarzbraunen, schließlich schwarzen Färbung und nach einiger Zeit die Abscheidung schwarzer Flocken unter Klärung der nahezu farblosen, überstehenden Flüssigkeit.

Um nun diesen Vorgang einer Messung zugänglich zu machen, erwiesen sich uns zwei Methoden als geeignet.

a) Methode der Sedimentierung. Dabei erfolgte die Schätzung der gebildeten Melaninmenge nach dem Volumen der entstandenen Pigmentfällung.

Die Serie der in bezug auf ihren Melaningehalt zu vergleichenden in Bechergläsern befindlichen Flüssigkeiten wurde bis zu dem gewünschten Zeitpunkte stehen gelassen. War bis dahin noch keine oder nur eine unvollständige Abscheidung des Pigmentniederschlages erfolgt, so wurde diese durch Aufkochen unter Zusatz von etwas Calciumchlorid bewirkt, jede der Flüssigkeiten mit den darin enthaltenen Pigmentflocken in ein Spitzglas übertragen und das Absetzen der letzteren abgewartet. Nach Entfernung der überstehenden klaren Flüssigkeit wurde jeder der Niederschläge in ein nach unten zu stark verschmälertes graduiertes, etwa 12 ccm fassendes, in Zehntelcubikcentimeter geteiltes Zentrifugiergläschen übertragen, sodann die ganze Serie gleichzeitig zentrifugiert. Es stand uns zu diesem Zwecke eine elektrisch betriebene Zentrifuge mit großer Umlaufsgeschwindigkeit zur Verfügung, welche mit Hilfe von acht an der Peripherie einer Scheibe suspendierten Metallhülsen das gleichzeitige Zentrifugieren von acht solchen graduierten Gläschen gestattete. Bei der Übertragung der Pigmentfällungen aus den Spitzgläsern in die Zentrifugiergläschen ließen sich Verluste leicht vermeiden, indem nach kurzdauerndem Zentrifugieren die überstehende Flüssigkeit beseitigt und durch Spülwasser aus den Spitzgläsern beliebig oft ersetzt werden konnte. War die Gesamtmenge der Niederschläge in die graduierten Gefäßchen übertragen, so wurde das Zentrifugieren in der Regel einige Stunden lang und zwar so lange fortgesetzt, bis eine Abnahme der schmalen Pigmentsäule im unteren Teile der Gläser praktisch nicht mehr zu bemerken war.

Kontrollproben, wobei von einer tintig geschwärzten Reaktionsflüssigkeit aliquote Teile abgemessen und erst dann durch Kochen unter Chlorcalciumzusatz „koaguliert“ wurden, ergaben die praktische Brauchbarkeit dieses Verfahrens, allerdings nur bei Gegenwart ausreichend großer Melaninmengen und innerhalb der Grenzen einer annähernden Schätzung.

b) Methode der spektrophotometrischen Messung. Ein unvergleichlich höheres Maß von Genauigkeit und überdies die Möglichkeit, auch sehr geringe Melaninmengen in einer und derselben Probe zu verschiedenen Zeiten messend miteinander zu vergleichen, bot uns die spektrophotometrische Methode[1]. Wir haben sie daher bei unseren späteren Versuchen ausschließlich benutzt.

Die zu messende Flüssigkeit wurde in einem Troge mit planparallelen Wänden und von 1 cm lichter Weite vor die untere Hälfte der Spalte eines Glanschen Spektrophotometers älterer Konstruktion (von Schmidt u. Hänsch in Berlin) gebracht. Als Spektralausschnitt (der selbstverständlich innerhalb derselben Serie keine Änderung erfahren durfte) wurde meist der Grenzbezirk zwischen Gelb und Grün, zuweilen auch Orange gewählt. Zur Beleuchtung diente ein Auerbrenner. Die Berechnung der Extinktionskoeffizienten erfolgte nach der Formel $E = -2(\log \operatorname{cotg} \alpha + \log \operatorname{tg} \beta)$, wobei α jene Winkelstellung des Nicols bedeutete, bei der Maximum der Helligkeit bestand, also keine verdunkelnde Flüssigkeit vorgeschaltet war, β jene Winkelstellung, auf die nach Vorlage des Troges mit der melaninhaltigen Flüssigkeit vor die untere Spalthälfte eingestellt wurde. Die Nullstellung wurde bei maximaler Verfinsterung des von der oberen Spalthälfte entworfenen Spektrums durch Drehung des Nicols und bei vollständiger Abblendung des anderen Spektrums bestimmt. Bezüglich zahlreicher Einzelheiten der Messung sei hier auf die Originalbeschreibung des Apparates (Wiedemanns Ann. der Physik 1, 351) sowie auf die ausführlichen Vorschriften in Hupperts Analyse des Harnes (9. Aufl., S. 441) verwiesen. Die Prüfung der Leistungsfähigkeit des Apparates an Oxyhämoglobinlösungen von bekanntem Gehalte ergab befriedigende Resultate.

Da bekanntlich zwischen der Konzentration einer Farbstofflösung und ihrem Extinktionskoeffizienten für einen bestimmten Spektralbezirk Proportionalität besteht, gestaltete die Bestimmung von E einen Rückschluß auf die relative Menge gebildeten Melanins. Auf die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses, welche einen Rückschluß auf die absolute Melaninmenge gestattet hätte, haben wir angesichts des Fehlens einer ausreichend reinen konzentrierten Standardlösung von künstlichem Melanin verzichtet.

Die mitgeteilten Werte für α sind die Mittel aus einer größeren Zahl, jeder Wert für β das Mittel aus mindestens zwei ausreichend übereinstimmenden Ablesungen.

4. Einfluß der Temperatur auf die Tyrosinasewirkung. Um zunächst festzustellen, wo ungefähr das Temperatur-

[1] Diese ist beim Studium der Melanine bereits von K. A. H. Mörner (l. c.) verwendet worden; allerdings nicht zur Mengen-, sondern zur Identitätsbestimmung von Pigmenten aus menschlichen Melanosarkomen und melanotischen Harnen.

optimum für die Tyrosinasewirkung liegt, wurden vier Proben bereitet, jede aus 4 ccm einer Fermentlösung aus Halimasch, 60 ccm einer alkalihaltigen Tyrosinlösung (s. o.) und 2 ccm Wasserstoffsuperoxydlösung von 3 Proz. bestehend; a) wurde bei 5 bis 7°, b) bei Zimmertemperatur, c) im Brutschrank bei etwa 40°, d) bei 55° gehalten. Zunächst war die Melaninbildung bei den in die Wärme gestellten Proben entschieden begünstigt; nach 1/2 Stunde war a) und b) noch nicht deutlich verändert, während c) dunkler und d) am dunkelsten erschien. Später kehrte sich aber das Verhältnis in höchst auffallender Weise um: am nächsten Morgen erschien a) und b) tintig geschwärzt, c) heller und d) bei weitem am hellsten. Der spektrophotometrische Vergleich nach Verdünnung jeder der Proben mit dem gleichen Volumen Wasser ergab als Wert für den Extinktionskoeffizienten, demnach als Proportionalitätsfaktor für die gebildete Melaninmenge: in a) 1,29, b) 0,55, c) 0,42, d) 0,22.

Wir glauben diesen auffallenden Befund derart deuten zu sollen, daß hier zwei Prozesse ineinander greifen: einerseits die den allgemeinen Gesetzen chemischer Kinetik entsprechende Reaktionsbeschleunigung bei steigender Temperatur, andererseits aber die in der Wärme schneller fortschreitende Zerstörung des labilen Fermentes. Zuerst kommt der erste, nach einiger Zeit aber der zweite dieser Faktoren stärker zur Geltung, welcher Umstand die beschriebene Umkehrungserscheinung herbeiführt, insofern also die Melaninbildung in der Wärme zwar schneller einsetzt, aber auch viel früher zum Stillstande kommt.

Die außerordentlich große Empfindlichkeit der Tyrosinase gegen die langdauernde Einwirkung höherer Temperaturen hat der eine[1]) von uns bereits seinerzeit bei der Tyrosinase des Insektenblutes beobachtet, deren Wirkung bereits bei 30° sistiert erschien.

Dagegen zeigt bei kurzdauerndem Erhitzen die Pilztyrosinase ein ähnliches Verhalten, wie die meisten anderen Fermente, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht.

Eine Reihe von Eprouvetten, je 3 ccm Fermentlösung aus Champignons, 3 ccm Tyrosinlösung und 2 ccm H_2O_2 von 3 Proz. enthaltend, wurde in einem Wasserbade und gleichzeitig mit demselben erwärmt und jeweilig bei Erreichung einer Temperaturstufe eine der Proben aus dem Bade herausgenommen. Alle Proben wurden sodann drei Tage lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen und die gebildeten Melaninmengen spektrophotometrisch bestimmt: ($\alpha = 54,8°$).

---

[1]) Fürth und Schneider, l. c., S. 234.

Probe, entnommen bei	Beobachteter Drehungswinkel des Nicols von der Nullage aus:	Extinktions-koeffizient	Probe, entnommen bei	Beobachteter Drehungswinkel des Nicols von der Nullage aus:	Extinktions-koeffizient
25°	$\beta = 44,1$	E 0,322	55°	$\beta = 51,2$	E 0,114
30	46,5	0,258	60	52,6	0,070
35	47,8	0,218	65	54,7	—
40	46,2	0,268	70	54,7	—
45	46,2	0,268	75	54,8	—
50	46,7	0,252	—	—	—

Wir sehen demnach die Kurve der Melaninbildung, die sich zwischen 30 bis 50° annähernd auf gleichem Niveau gehalten hatte, von da ab jäh absinken, derart, daß sie bereits zwischen 60 bis 65° die Abszisse erreicht.

5. Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf die Tyrosinasewirkung. Eine weitere Versuchsreihe wurde zur Feststellung des Einflusses wechselnder Wasserstoffsuperoxydkonzentrationen auf die Tyrosinasewirkung ausgeführt.

A. Jede Probe enthielt 1 ccm Ferment (aus Halimasch) und 30 ccm Tyrosinlösung, ferner

a) 1 ccm H_2O_2, von 0,3 Proz. + 79 ccm Wasser
b) 5 „ „ „ 0,3 „ + 75 „ „
c) 10 „ „ „ 0,3 „ + 70 „ „
d) 15 „ „ „ 0,3 „ + 65 „ „
e) 20 „ „ „ 0,3 „ + 60 „ „

Die Proben wurden nach 5 Tagen bei Zimmertemperatur sedimentiert und zentrifugiert. Die Höhe der Melaninsäule betrug in a) 5, b) 5, c) 5, d) 8, e) 8 Teilstriche.

B. Jede Probe enthielt 3 ccm Fermentlösung und 30 ccm Tyrosinlösung, ferner:

	Nach 5 Tagen sedimentiert und zentrifugiert:
a) 2 ccm H_2O_2 von 0,3 Proz. + 18 ccm Wasser . .	1½ Teilstriche
b) 4 „ „ „ 0,3 „ + 16 „ „ . .	3 „
c) 12 „ „ „ 0,3 „ + 8 „ „ . .	4 „
d) 16 „ „ „ 0,3 „ + 4 „ „ . .	3¾ „
e) 20 „ „ „ 0,3 „ + 0 „ „ . .	1¾ „

C. Jede Probe enthielt 3 ccm Fermentlösung (aus Champignons) und 5 ccm Tyrosin; spektrophotometrische Untersuchung nach 24 Stunden ($\alpha = 51,0°$).

a) 0 ccm H_2O_2 von 0,3 Proz. + 4 ccm Wasser . . .	$\beta = 11,9°$	E 1,538
b) ¼ „ „ „ 0,3 „ + 3¾ „ „ . . .	11,9	1,538
c) ½ „ „ „ 0,3 „ + 3½ „ „ . . .	12,1	1,522
d) 1 „ „ „ 0,3 „ + 3 „ „ . . .	11,5	1,568
e) 2 „ „ „ 0,3 „ + 2 „ „ . . .	32,5	0,576
f) 4 „ „ „ 0,3 „ + 0 „ „ . . .	41,0	0,306

D. Parallelversuch zum vorigen; spektrophotometrische Untersuchung, jedoch bereits nach 16 Stunden.

a)	0 ccm H_2O_2	von 0,3 Proz.	+ 4	ccm Wasser	. . .	β = 18,6°	E 1,130
b)	1/4 „ „	„ 0,3 „	+ 3 3/4	„ „	. . .	18,5	1,136
c)	1/2 „ „	„ 0,3 „	+ 3 1/2	„ „	. . .	13,6	1,416
d)	1 „ „	„ 0,3 „	+ 3	„ „	. . .	19,4	1,090
e)	2 „ „	„ 0,3 „	+ 2	„ „	. . .	33,0	0,542
f)	4 „ „	„ 0,3 „	+ 0	„ „	. . .	43,0	0,244

Aus den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß die **Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd die Tyrosinasewirkung erheblich befördern kann, daß ein Zuviel von Wassersuperoxyd die Wirkung aber hemmt bzw. aufhebt.** Die Konzentration, bei der letzteres der Fall ist, lag bei den Versuchen B, C und D bei einem Wasserstoffperoxydgehalt der Flüssigkeit von 0,02 bis 0,06 Proz.; im Versuche A war bei einem H_2O_2-Gehalt von 0,05 Proz. die Grenze noch nicht erreicht.

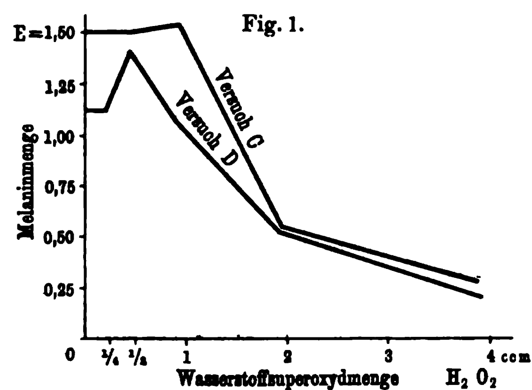


Fig. 1.

6. Einfluß der Tyrosinkonzentration und der Alkaleszenz auf die Tyrosinasewirkung.

A. Proben, je 1 ccm Fermentlösung (Halimasch) und 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 0,3 Proz. enthaltend, wurden versetzt mit

a)	10 ccm Tyrosinlösung	+	50 ccm Wasser
b)	20 „ „	+	40 „ „
c)	30 „ „	+	30 „ „
d)	40 „ „	+	20 „ „
e)	50 „ „	+	10 „ „

Nach 5 Tagen bei Zimmertemperatur zentrifugiert; Höhe der Säule: a) 1/2, b) 1, c) 2 1/2, d) 3 1/2, e) 6 Teilstriche.

B. Proben, je 2 ccm Fermentlösung (Halimasch) und 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 0,3 Proz. enthaltend, wurden versetzt mit

a)	10 ccm Tyrosin	+	50 ccm Wasser
b)	20 „ „	+	40 „ „
c)	30 „ „	+	30 „ „
d)	40 „ „	+	20 „ „
e)	50 „ „	+	10 „ „

Nach 8 Tagen bei Zimmertemperatur zentrifugiert; Höhe der Säule: a) 1, b) $1^1/_2$, c) $1^3/_4$, d) 3, e) $5^1/_2$ Teilstriche.

Da bei diesen Versuchen aber nicht nur der Tyrosingehalt, sondern infolge des Sodagehaltes der zugesetzten Tyrosinlösung auch die Alkalikonzentration variiert worden war, wurden weitere Versuche unter Ausschaltung dieser Fehlerquelle ausgeführt:

C. Proben, 4 ccm Fermentlösung (Halimasch) und 5 ccm Wasserstoffsuperoxyd von 0,3 Proz. enthaltend, wurden versetzt mit

a) 10 ccm	Tyrosinlösung	+ 50 ccm	Natriumcarbonat	von	0,04	Proz.
b) 20 „	„	+ 40 „	„	„	0,04	„
c) 30 „	„	+ 30 „	„	„	0,04	„
d) 40 „	„	+ 20 „	„	„	0,04	„
e) 50 „	„	+ 10 „	„	„	0,04	„

Nach 9 Tagen zentrifugiert; Höhe der Säule: a) $3^1/_2$, b) 4, c) 5, d) 6, e) 6 Teilstriche.

D. Wiederholung des vorigen Versuches. Höhe der Säule: a) $2^3/_4$, b) $3^3/_4$, c) $4^1/_2$, d) 5, e) $6^1/_2$ Teilstriche.

Die Zunahme der Melaninbildung bei vermehrter Tyrosinkonzentration und gleichbleibender Fermentkonzentration war also auch hier tatsächlich vorhanden und keineswegs ausschließlich durch eine Alkaleszenzänderung vorgetäuscht.

Daß übrigens selbst weitgehende Änderungen der Alkaleszenz unter Umständen ohne wesentlichen Einfluß auf den Endeffekt der Pilztyrosinase sein können, zeigt folgender Versuch:

E. Proben, je 10 ccm Fermentlösung aus Champignons, 5 ccm Tyrosinlösung und 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd enthaltend, wurden versetzt mit

							$\beta =$	E
a)	0 ccm	Natriumcarbonat	von 0,04	Proz.	+ 10 ccm	Wasser	21,8°	1,048
b)	2 „	„	„ 0,04	„	+ 8 „	„	23,2	0,992
c)	4 „	„	„ 0,04	„	+ 6 „	„	23,0	0,996
d)	6 „	„	„ 0,04	„	+ 4 „	„	23,7	0,968
e)	8 „	„	„ 0,04	„	+ 2 „	„	22,7	1,010
f)	10 „	„	„ 0,04	„	+ 0 „	„	23,3	0,984

Die spektrophotometrische Untersuchung ist nach zwei Tagen bei Zimmertemperatur ausgeführt worden ($\alpha = 53,2°$). Die hier beobachtete Veränderung der E-Werte ist trotz der um ein Vielfaches gesteigerten Alkalimenge eine unbedeutende (und zwar im Sinne einer geringen Hemmungswirkung).

Auch eine einfache Verdünnung ohne gleichzeitige Verschiebung des Verhältnisses zwischen Ferment-, Tyrosin- und Alkalikonzentration kann innerhalb weiter Grenzen ohne wesentlichen Einfluß auf die schließlich gebildete Melaninmenge sein:

F. Proben, je 4 ccm Fermentlösung, 30 ccm Tyrosinlösung und 5 ccm Wasserstoffsuperoxyd enthaltend, wurden durch Zusatz von a) 20, b) 40, c) 60, d) 80, e) 100 ccm Natriumcarbonatlösung von 0,4 Proz. verdünnt und nach 10 tägigem Stehen zentrifugiert: die Höhe der Säule betrug für a) 5, b) $3^1/_2$, c) $3^1/_2$, d) 3, e) 3 Teilstriche.

Übrigens sei hier daran erinnert, daß bei den mitgeteilten Versuchen nur von dem Endzustande die Rede ist, bei dem die Reaktion schließlich stehen bleibt, daß aber über die Schnelligkeit, mit der die Reaktion einsetzt und mit der sie bis zu dem Endzustande verläuft, nichts ausgesagt wird. Bereits früher (Versuch 4 A) ist auf die grundsätzliche Verschiedenheit dieser beiden Begriffe hingewiesen worden.

7. Beziehungen zwischen Fermentmenge und dem Quantum gebildeten Melanins. Um festzustellen, ob sich bei der Tyrosinase zwischen Fermentmenge und Quantum des gebildeten Reaktionsproduktes in ähnlicher Weise, wie dies bei anderen Fermenten vielfach geschehen ist, einfache gesetzmäßige Beziehungen ableiten lassen, wurde eine größere Zahl von Versuchen ausgeführt.

Bei den ersten orientierenden Versuchen bedienten wir uns der Zentrifugiermethode.

Versuch A. Probe, je 60 ccm alkali- und wasserstoffsuperoxydhaltiger Tyrosinlösung (Tyrosin 0,05 Proz. + Na_2CO_3 0,04 Proz. + H_2O_2 0,005 Proz.) wurden versetzt mit

				Nach 5 Tagen zentrifugiert; Höhe der Säule:
a)	2 ccm Fermentlösung	+	10 ccm H_2O	. . . . 10 Teilstriche
b)	4 „ „	+	8 „ „	. . . . 13 „
c)	6 „ „	+	6 „ „	. . . . 14 „
d)	8 „ „	+	4 „ „	. . . . 19 „
e)	10 „ „	+	2 „ „	. . . . 23 „
f)	12 „ „	+	0 „ „	. . . . 24 „

Versuch B. Proben, je 60 ccm Tyrosinlösung (Tyrosin 0,05 Proz. + Na_2CO_3 0,04 Proz.) und 2 ccm H_2O_2 0,3 Proz. enthaltend, dazu

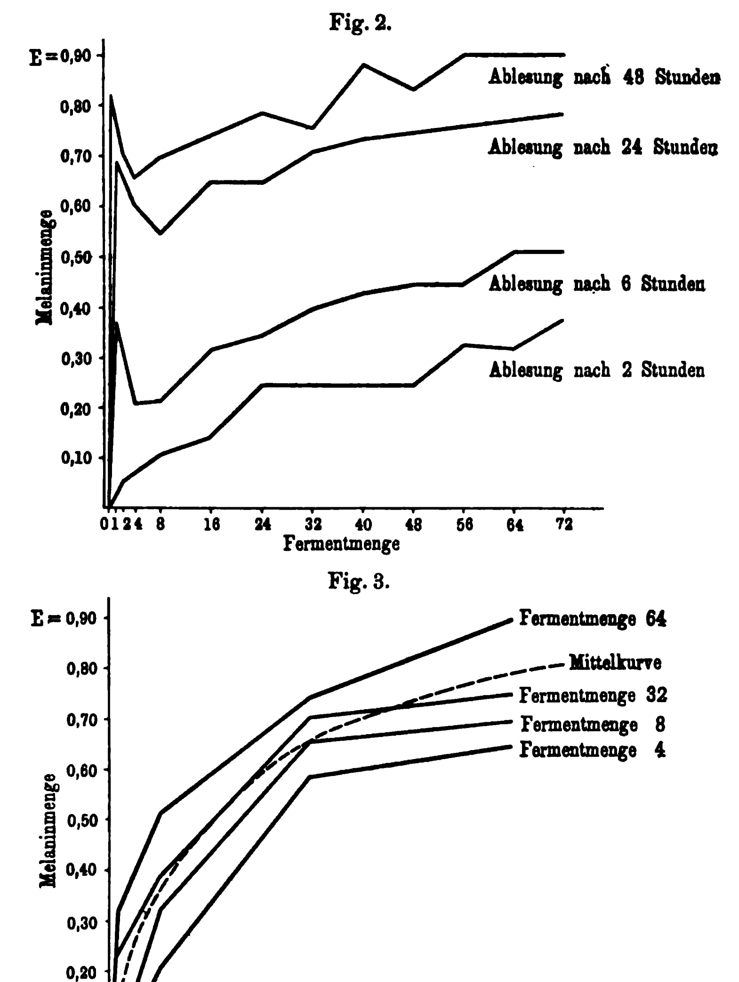
				Nach 5 Tagen zentrifugiert; Höhe der Säule:
a)	1 ccm Fermentlösung	+	15 ccm H_2O	. . . . 4 Teilstriche
b)	2 „ „	+	14 „ „	. . . . $4^1/_2$ „
c)	4 „ „	+	12 „ „	. . . . 5 „
d)	8 „ „	+	8 „ „	. . . . $6^1/_2$ „
e)	16 „ „	+	0 „ „	. . . . $8^1/_2$ „

Versuch C. Proben, je 30 ccm Tyrosinlösung und 2 ccm H_2O_2 0,3 Proz. enthaltend, dazu

				Nach 10 Tagen zentrifugiert; Höhe der Säule:
a)	1 ccm Fermentlösung	+	19 ccm H_2O	. . . . $1^1/_2$ Teilstriche
b)	2 „ „	+	18 „ „	. . . . 2 „
c)	4 „ „	+	16 „ „	. . . . 5 „
d)	8 „ „	+	12 „ „	. . . . $6^1/_2$ „
e)	16 „ „	+	4 „ „	. . . . $7^1/_2$ „

Schon diese orientierenden Versuche klärten uns darüber auf, daß hier die Verhältnisse viel komplizierter liegen als z. B. beim Pepsin, dem Trypsin und der Lipase, wo durchsichtige numerische

Fig. 2.



Beziehungen (Wurzelgesetz) zwischen Fermentmenge und Reaktionsprodukt bestehen und setzten unsere Hoffnungen auf die Ableitung eines einfachen „Fermentgesetzes“ auf ein geringes Maß herab.

Weitere Versuche mit der unvergleichlich leistungsfähigeren und empfindlicheren spektrophotometrischen Methode förderten nun in der Tat auffallende und schwer zu deutende Befunde zutage.

Versuch D. Fermentpräparat aus Halimasch, im Vakuum getrocknet, nach einmonatlicher Aufbewahrung mit Chloroformwasser extrahiert; vollkommen katalasefrei. Proben, je 5 ccm Tyrosinlösung und 2 ccm H_2O_2 von 0,3 Proz. enthaltend, $\alpha = 52{,}6$.

Probe		Relative Fermentmenge	Ablesung nach							
			2 Stdn.		6 Stdn.		24 Stdn.		48 Stdn.	
Ferment ccm	H_2O ccm		β^0	E	β^0	E	β^0	E	β^0	E
a) 1/4	+ 17 3/4	1	51,8	0,026	40,2	0,380	31,6	0,656	27,7	0,814
b) 1/2	+ 17 1/2	2	51,6	0,032	41,9	0,328	31,0	0,676	29,7	0,722
c) 1	+ 17	4	50,7	0,060	45,8	0,210	33,2	0,602	31,4	0,662
d) 2	+ 16	8	49,2	0,106	45,4	0,222	34,7	0,554	30,5	0,694
e) 4	+ 14	16	47,9	0,146	42,3	0,316	31,6	0,656	28,7	0,758
f) 6	+ 12	24	44,7	0,244	41,3	0,346	31,8	0,650	28,1	0,780
g) 8	+ 10	32	44,4	0,254	39,7	0,396	30,2	0,706	28,7	0,758
h) 10	+ 8	40	44,9	0,238	38,6	0,430	29,2	0,732	25,4	0,882
i) 12	+ 6	48	44,6	0,252	38,0	0,450	28,3	0,772	26,6	0,834
k) 14	+ 4	56	41,6	0,338	37,6	0,462	28,3	0,772	24,9	0,900
l) 16	+ 2	64	41,9	0,328	35,8	0,518	23,9	0,750	24,6	0,914
m) 18	+ 0	72	39,9	0,390	35,5	0,528	28,1	0,788	24,9	0,900

(Vgl. Fig. 2.)

Aus den Beobachtungen der vorliegenden Versuchsreihe läßt sich auch ein Einblick in den zeitlichen Ablauf des Vorganges der Melaninbildung gewinnen, wenn man die einzelnen den Proben entsprechenden Ablesungen in Kurvenform mit den Zeitwerten als Abszissen und die Melaninmengen als Ordinaten aufträgt. (Vgl. Fig. 3.)

Versuch E. Fermentpräparat aus Halimasch, mehrere Wochen im Vakuum bei Zimmertemperatur getrocknet, sodann mit Chloroformwasser extrahiert. Das Präparat erweist sich vollkommen katalasefrei.

Es bedeutet

β den Winkelwert der Nicoldrehung,

E den nach der Formel $E = -2(\log \operatorname{cotg} \alpha + \operatorname{tg} \beta)$ berechneten Extinktionskoeffizienten,

C eine Korrektur für die Nachdunkelung der Fermentlösung als solcher,

E' den korrigierten Wert für den Extinktionskoeffizienten,

M die Verhältniszahlen für die Melaninkonzentrationen.

1. Ablesung nach einem Tage bei Zimmertemperatur ($\alpha = 51{,}1^0$; für die nachgedunkelte Fermentlösung beträgt $\beta = 32{,}8$; daraus berechnet $E = 0{,}57$). — Jede Probe enthält 5 ccm Tyrosinlösung und 2 ccm H_2O_2 von 0,3 Proz.

Probe	Relation der Fermentmenge	β	E	C	M = E'	Relation der Melaninmenge
a) ½ ccm Ferment + 7½ ccm H_2O	1	11,0°	1,61	0,02	1,59	1
b) 1 " " + 7 " "	2	6,7	2,05	0,04	2,01	1,3
c) 2 " " + 6 " "	4	5,0	2,30	0,08	2,22	1,4
d) 4 " " + 4 " "	8	9,8	1,71	0,16	1,55	1
e) 8 " " + 0 " "	16	9,5	1,74	0,32	1,42	0,9

2. Ablesung nach 2 Tagen:

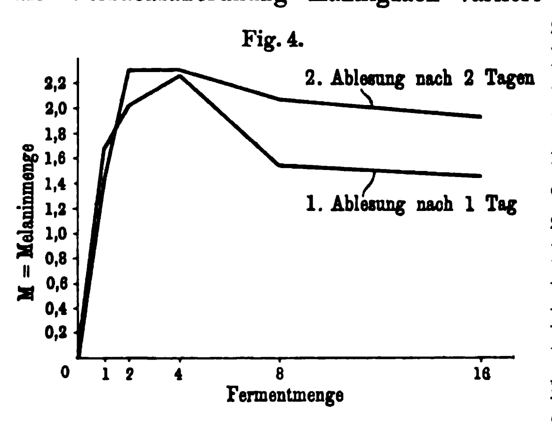
Jede der Proben wurde vor der Ablesung mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt ($\alpha = 51,6°$).

Probe	Relation der Fermentmenge	β	E	M (= 2 E')	Relation der Melaninmenge
a)	1	26,8°	0,796	1,57	1
b)	2	19,0	1,128	2,22	1,4
c)	4	18,6	1,148	2,22	1,4
d)	8	19,8	1,090	2,02	1,3
e)	16	19,0	1,128	1,90	1,2

(Vgl. Fig. 4.)

Es wurden noch sechs weitere Versuche (F bis L) ähnlicher Art (mit und ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd) mit Fermentmaterial aus Agaricus melleus und campestris ausgeführt, wobei die Versuchsanordnung mannigfach variiert wurde; z. B. wurde zur Verdünnung der Proben Chloroformwasser statt gewöhnlichen Wassers benutzt u. dgl. Speziell die im Versuche L zur Verwendung gelangte Fermentlösung wurde aus einem drei Monate lang aufbewahrten Trockenpräparate hergestellt und durch Schütteln mit Cholesterin (Eingießen alkoholischer Cholesterinlösung in die fermenthaltige Flüssigkeit) von Beimengungen soweit befreit, daß sie mit Phosphorwolframsäure nur eine Trübung, beim Sättigen mit Ammonsulfat keine Fällung gab und nur eine Andeutung von

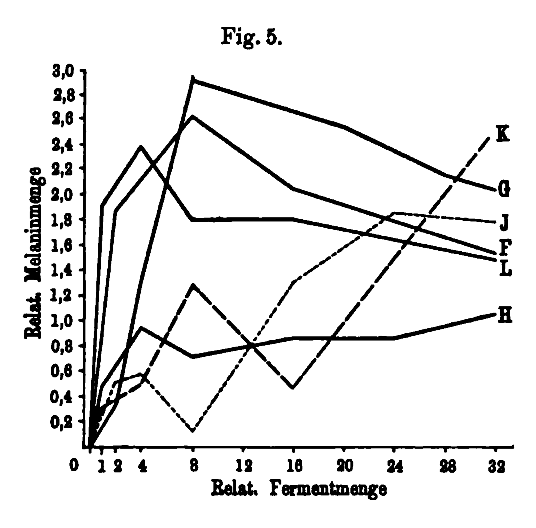
Fig. 4.



Biuretreaktion zeigte. Um Weitschweifigkeiten der Darstellung zu vermeiden, dürfte es genügen, das Resultat dieser Versuche in einer Tabelle graphisch zu registrieren [1]). (Vgl. Fig. 5.)

In jedem der Versuche D bis L machte sich die höchst merkwürdige und auch ohne Messung bei einfachem Betrachten der Proben ins Auge fallende Erscheinung mit großer Regelmäßigkeit geltend, daß von einer gewissen Fermentmenge an ein weiterer Fermentzusatz statt der erwarteten Zunahme eine Abnahme des gebildeten Melaninquantums bewirkte.

Fig. 5.



Diese Erscheinung war namentlich in den ersten Stadien der Melaninbildung auffällig. Beobachtete man die Serien längere Zeit, so verwischte sie sich mehr und mehr; sie kam daher in den erst nach 5 bis 10 Tagen beobachteten Versuchen A, B und C nicht zur Geltung.

Es läge vielleicht nahe, diese Erscheinung zu den Phänomenen der sogenannten „Komplementablenkung" im Sinne Ehrlichs in Parallele zu bringen. Bekanntlich haben Neisser und Wechsberg [2]) gefunden, daß bei der durch ein Zusammenwirken von Amboceptor und Komplement erfolgenden Abtötung von Bakterien durch bakterizide Sera ein Überschuß von Amboceptor die Wirkung zu hemmen bzw. ganz aufzuheben vermag, und haben diese Erscheinung im Sinne einer Komplementablenkung gedeutet.

O. Cohnheim [3]) hat bei seinen Beobachtungen über Glykolyse durch kombinierte Wirkung von Muskelsaft und Pankreas gefunden, daß, wenn man zu einer gleichbleibenden Menge von Muskelsaft und Zucker steigende Mengen Pankreas hinzusetzt, die glykolytische Wirkung erst zu-, dann abnimmt und auf die Analogie dieser Erscheinung mit der „Komplementablenkung" hingewiesen.

---

[1]) Die Mehrzahl der Versuche wurden zwei Tage hintereinander abgelesen; doch haben wir uns, um die Darstellung nicht zu verwirren, mit der Wiedergabe einer Ablesung begnügt.

[2]) Neisser und Wechsberg, Münchener Med. Wochenschrift 1901, Nr. 18.

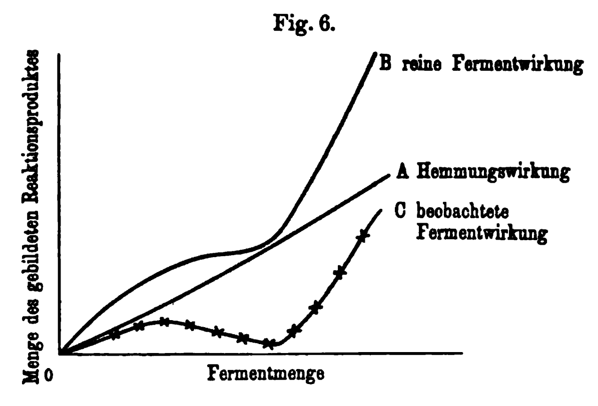
[3]) O. Cohnheim, Über Kohlenhydratverbrennung. Zweite Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 404.

Ohne auf die Diskussion dieses Begriffes näher einzugehen, möchten wir nur darauf hinweisen, daß eine „Komplementablenkung“ in unserem Falle allenfalls den Abfall der Melaninmenge mit steigender Fermentmenge, aber wohl kaum den neuerlichen Anstieg der Kurve bei weiterer Fermentzufuhr erklären könnte.

Am ungezwungensten wäre vielleicht die Vermutung, daß die beschriebenen Erscheinungen dadurch entstanden sind, daß sich über die eigentliche wahre Fermentwirkung noch ein hemmender Einfluß superponiert hat.

Nehmen wir beispielsweise an, die hemmende Wirkung wäre der Menge der Fermentlösung direkt proportional (Linie *A*), die reine Fermentwirkung in ihrer Abhängigkeit von der Fermentmenge aber durch eine erst sanft, dann aber steil ansteigende Kurve gegeben, wie es beifolgende Skizze andeutet (Kurve *B*).

Fig. 6.



Eine Kurve, welche nunmehr nicht die reine, sondern die tatsächlich zur Beobachtung gelangende Fermentwirkung ausdrückt, muß derart beschaffen sein, daß für jeden ihrer Punkte die Ordinate gleich der Differenz der zur gleichen Abszisse gehörigen Ordinaten der Kurve *B* und der Linie *A* ist. Konstruiert man diese Kurve (*C*) unter den genannten Voraussetzungen, so sieht man ohne weiteres, daß eine solche Kurve erst steigen, dann sinken und dann erst wieder in die Höhe gehen wird, also tatsächlich die Eigentümlichkeiten unserer Tyrosinasekurven aufweist.

Daß ein solcher hemmender Einfluß nicht etwa durch die Anwesenheit von Wasser, Chloroform, Glycerin oder Wasserstoffsuperoxyd in unseren Proben bedingt war, ergibt sich aus den Versuchen. Es erschien jedoch (angesichts der Regelmäßigkeit, mit der diese Erscheinung aufgetreten ist, und zwar in Fermentlösungen, die aus zwei verschiedenen Pilzarten nach wechselnden Methoden her-

gestellt worden waren) auch wenig wahrscheinlich, daß es sich um eine zufällige Beimengung gehandelt habe.

Es ergab sich nunmehr die Forderung, diese Beobachtungen an möglichst heterogenem Fermentmaterial, und zwar solchem nicht pflanzlichen, sondern tierischen Ursprunges nachzuprüfen, um derart das Wesentliche vom Unwesentlichen der Erscheinungen besser unterscheiden zu können. Über derartige Versuche mit der Tyrosinase des Insektenblutes soll im folgenden berichtet werden.

B. Tierische Tyrosinase.

1. Darstellung tierischer Tyrosinase. Die Darstellung tierischer Tyrosinase erfolgte, von Lepidopterenhämolymphe ausgehend, nach dem seinerzeit von dem einen uns gemeinsam mit Schneider[1]) beschriebenen Verfahren. Als Ausgangsmaterial dienten meist die Puppen des Wolfmilchschwärmers (Deliphila Euphorbiae), gelegentlich auch solche der Arten Platysamia Cecropia und Atacus Cynthia. Das Verfahren beruht darauf, daß die Hämolymphe durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt und der gewaschene und abgepreßte Niederschlag in Sodalösung von 0,04 Proz. gelöst wird. Die so erhaltene Lösung erweist sich stark tyrosinasehaltig.

2. Einfluß von Wasserstoffsuperoxyd, Alkaleszenz und Katalysatoren. Um zunächst den Einfluß des Wasserstoffsuperoxyds auf tierische Tyrosinase festzustellen, wurde folgende Serie aufgestellt: Proben, je 1 ccm Fermentlösung und 1 ccm Tyrosinlösung enthaltend, ferner: a) 0 ccm H_2O_2 + 0,9 ccm H_2O; b) 0,3 ccm H_2O_2 + 0,6 ccm H_2O; c) 0,6 ccm H_2O_2 + 0,3 ccm H_2O; d) 0,9 ccm H_2O_2 + 0 ccm H_2O. Während der ersten Stunden waren die wasserstoffsuperoxydhaltigen Proben den H_2O_2-freien gegenüber in der Melaninbildung stark voraus; später glich sich aber dieser Vorsprung aus und bei der spektrophotometrischen Untersuchung am folgenden Tage fielen die Unterschiede bei allen vier Proben in die Fehlergrenzen: a) β 5,8°, E 2,272; b) β 6,2°, E 2,216; c) β 6,1°, E 2,228; d) β 6,6°, E 2,160. Es war also nur die Schnelligkeit der Melaninbildung, nicht aber der Endzustand durch die Gegenwart des Wasserstoffsuperoxyds beeinflußt worden.

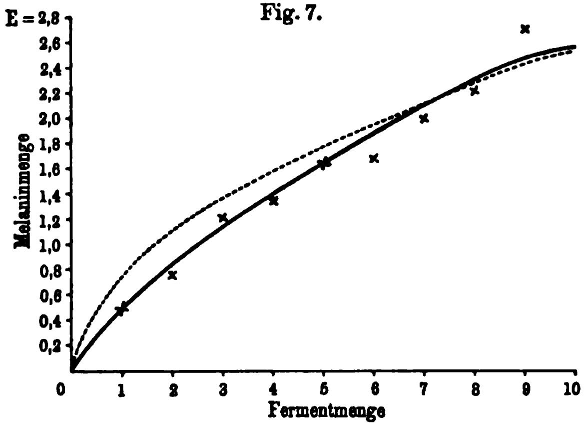
Um den Einfluß der Alkaleszenz zu prüfen, wurde folgende Serie aufgestellt: Proben, je 1 ccm Tyrosin und 1 ccm Fermentlösung enthaltend, ferner wechselnde Mengen (0,2 bis 1 ccm) Normalsäure bzw. Alkali mit soviel Wasser, daß die Gesamtmenge

[1]) O. v. Fürth und Schneider, l. c., S. 234.

der Flüssigkeit 3 ccm betrug. Es ergab sich, daß jeder Säurezusatz, auch der schwächste, die Tyrosinasewirkung ganz aufhob, während der Alkalizusatz eine, wenn auch nicht sehr bedeutende, fördernde Wirkung aufwies.

Zur Prüfung der Wirkung metallischer Katalysatoren konnte das gewöhnliche Verfahren nicht dienen, da das Natriumcarbonat der Ferment- und Tyrosinlösung die Schwermetallsalze gefällt hätte. Wir gingen deshalb einfach derart vor, daß wir verdünnte Hämolymphe mit wässeriger, gesättigter Tyrosinlösung mischten. Wurde ein solches Gemenge mit dem gleichen Volumen a) Wasser, b) Mangansulfat 1 Proz., c) Ferrosulfat 1 Proz. d) Kupfersulfat 1 Proz., e) Nickelsulfat 1 Proz. versetzt, so erwies sich nur der Manganzusatz als für die Melaninbildung förderlich; Ferrosulfat

Fig. 7.



und Kupfersulfat wirkten aber in dieser Konzentration direkt hemmend. Auch als die 1 proz. Ferrosulfatlösung durch eine solche von 0,8, 0,6, 0,4, 0,2 Proz. ersetzt wurde, erschien die Tyrosinasewirkung aufgehoben. Als wir aber zu einem Gemenge gleicher Teile zehnfach verdünnter Hämolymphe und wässeriger Tyrosinlösung ein Viertel Volumen 0,02 proz. Ferrosulfatlösung hinzufügten, machte sich der fördernde Einfluß des Katalysators deutlich bemerkbar.

Wir möchten dies als methodisch wichtig insofern betonen, als Durham[1]), wie erwähnt, einen Zusatz von Ferrosulfat für den Nachweis der Tyrosinase in Geweben empfiehlt[2]) und ein Zuviel dieses Aktivators demnach sorgfältig vermieden werden muß.

[1]) l. c.

[2]) „A portion was placed in a test tube with solid tyrosine and a milligram of ferrous sulfate was added as a activator.“

3. Beziehungen zwischen der Menge von Tyrosinase und entstandenem Melanin.

Versuch A. Proben, je 1 ccm Tyrosinlösung, ferner 0,4 bis 4,0 ccm Fermentlösung und soviel Natriumcarbonat enthaltend, daß die Gesamtmenge der Flüssigkeit 5 ccm betrug. Ablesung nach $2^1/_2$ Stunden ($\alpha = 52,2°$).

Fermentmenge	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,2	3,6	4,0 ccm
β	35,3	27,5	17,1	14,4	11,2	10,7	7,4	5,7	3,1	4,3 Grad
E	0,520	0,788	1,244	1,402	1,626	1,668	1,992	2,222	2,746	2,508

(vgl. Fig. 7).

Versuch B. Da die mit tierischer Tyrosinase angesetzten Proben sehr schnell ausflockten und die mögliche Beobachtungsdauer der Versuche dadurch in unerwünschter Weise abgekürzt wurde, stellten wir weitere Versuche unter Zusatz einer Gummilösung an, die infolge ihrer viskösen Beschaffenheit die Abscheidung des gebildeten Melanins in Flockenform erheblich verzögerte. Es wurden zwei Ablesungen der Serie ausgeführt, die eine nach zwei Stunden mit den unverdünnten Proben ($M = E$), die andere nach 24 Stunden mit den dreifach verdünnten Proben ($M = 3\,E$).

	Ablesung nach			
	3 Stunden		2 Stunden	
	$\beta°$	$M=E$	$\beta°$	$M=3E$
a) 0,4 ccm Ferm.-Lösg. + 3,6 ccm Na_2CO_3 0,04 proz.	46,8	—	39,6	0,654
b) 0,8 " " + 3,2 " " 0,04 "	33,2	0,422	33,1	1,278
c) 1,2 " " + 2,8 " " 0,04 "	27,8	0,610	30,0	1,596
d) 1,6 " " + 2,4 " " 0,04 "	18,5	1,006	22,4	2,472
e) 2,0 " " + 2,0 " " 0,04 "	17,5	1,056	21,3	2,622
f) 2,4 " " + 1,6 " " 0,04 "	16,2	0,980	21,7	2,562
g) 2,8 " " + 1,2 " " 0,04 "	17,3	1,068	22,1	2,508
h) 3,2 " " + 0,8 " " 0,04 "	15,2	1,188	22,5	2,460
i) 3,6 " " + 0,4 " " 0,04 "	14,8	1,210	20,2	2,766
k) 4,0 " " + 0 " " 0,04 "	14,0	1,260	21,5	2,592

Versuch C. Wiederholung des vorigen Versuches ($\alpha = 51,8°$).

	Ablesung nach			
	3 Stunden		24 Stunden	
	$\beta°$	$M=E$	$\beta°$	$M=E$
a) 0,4 ccm Ferment + 3,6 ccm Na_2CO_3 0,4 proz. .	32,8	0,590	31,7	1,864
b) 1,2 " " + 2,8 " " 0,4 " .	22,4	0,978	29,0	2,160
c) 2,4 " " + 1,6 " " 0,4 " .	17,1	1,232	24,3	2,649
d) 2,8 " " + 1,2 " " 0,4 " .	16,0	1,294	23,8	2,754
e) 3,2 " " + 0,8 " " 0,4 " .	16,6	1,258	22,7	2,904
f) 3,6 " " + 0,4 " " 0,4 " .	14,4	1,390	22,5	2,922
g) 4,0 " " + 0 " " 0,4 " .	16,6	1,294	20,1	3,246

Versuch D (Versuchsanordnung wie in B). Ablesung nach 3 Stunden ($\alpha = 49{,}8°$).

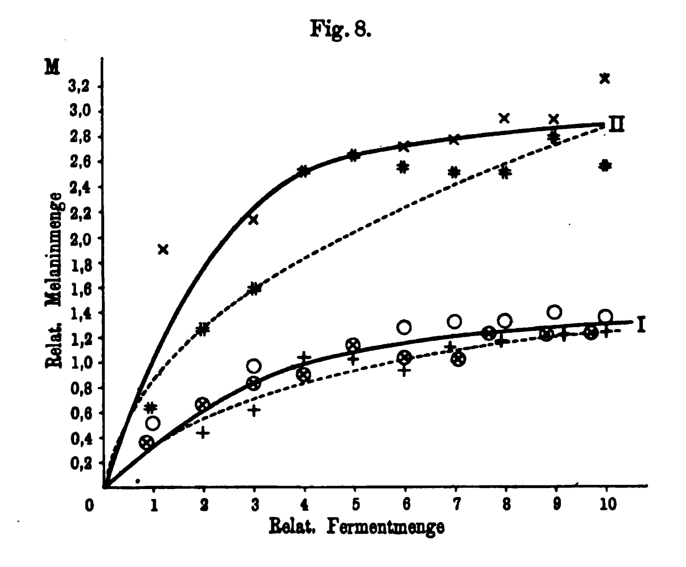
Probe	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k
β . . .	36,0	29,4	24,3	22,1	18,6	19,4	19,1	15,9	16,0	16,0
$M = E$	0,404	0,644	0,836	0,928	1,092	1,048	1,068	1,236	1,232	1,232

Wir stellen die Ergebnisse der Versuche B, C und D in der beifolgenden Skizze (Fig. 8) graphisch dar. Dabei bedeuten die Zeichen

+	die ersten	Ablesungen	des	Versuches	B
#	„ zweiten	„	„	„	B
○	„ ersten	„	„	„	C
×	„ zweiten	„	„	„	C
⊕	„ ersten	„	„	„	D

Die Kurve I schmiegt sich in ihrem Laufe annähernd den ersten Ablesungen, die Kurve II den zweiten Ablesungen an.

Fig. 8.



Der Verlauf dieser Kurve läßt soviel erkennen, daß die bei den analogen Versuchen mit pflanzlicher Tyrosinase regelmäßig auftretende „Überschußhemmung“ hier nicht in Erscheinung tritt. Der Verlauf der Kurven ist, von den durch Versuchsfehler bedingten Abweichungen abgesehen, hier viel regelmäßiger. Bezüglich der numerischen Beziehungen zwischen Fermentmenge und gebildeter Melaninmenge läßt sich feststellen, daß sicherlich nicht das Verhältnis einfacher Proportionalität besteht. Von einem gewissen Punkte an verläuft die Kurve fast horizontal, derart, daß ein weiterer Fermentzusatz keine wesentliche Steige-

rung der gebildeten Melaninmenge bewirkt. Vielleicht könnte man daran denken, das in der Fermentchemie immer wieder auftauchende Wurzelgesetz auch hier zur Anwendung zu bringen. Allein ein Blick auf die Figuren 7 und 8, in denen durch punktierte Linien jener Verlauf der Kurven angedeutet ist, der dem Postulate des Wurzelgesetzes entsprechen würde, lehrt, daß die Übereinstimmung zwischen Beobachtung und Theorie keineswegs ausreicht, um eine so einfache Formulierung zu rechtfertigen. Sicherlich wird erst eine weitere Ausgestaltung der Methodik und ein weit umfangreicheres Beobachtungsmaterial erforderlich sein, um eine rechnerische Formulierung der Kinetik der Tyrosinasen erfolgreich in Angriff nehmen zu können. Wir müssen uns vorderhand mit der Feststellung begnügen, daß, wenn sich auch bei den pflanzlichen Tyrosinasen angesichts des atypischen Kurvenlaufes eine solche Aufgabe wenig einladend präsentiert, dieses Problem bei der tierischen Tyrosinase unter Anwendung der spektrophotometrischen Methode nicht aussichtslos erscheint.

4. Antityrosinase. Wir haben uns schließlich der spektrophotometrischen Methode bedient, um die von Gessard[1]) behauptete immunisatorische Bildung von Antityrosinase nach Einführung von Tyrosinase in den Organismus einer Nachprüfung zu unterziehen.

Einem Kaninchen wurde etwas Blut durch Aderlaß entnommen und nach erfolgter Gerinnung des abgehobenen Serums in einem sterilen Gefäße in einer Toluolatmosphäre in der Kälte aufbewahrt. Das Kaninchen erhielt darauf 150 ccm einer sehr wirksamen Lösung tierischer Tyrosinase und zwei Tage später die gleiche Dosis subkutan injiziert. Am Tage darauf ging das Tier zugrunde. Das frische Serum wurde nunmehr mit demjenigen, welches dem normalen Tiere entnommen worden war, bezüglich seines Vermögens, die Tyrosinasewirkung zu hemmen, verglichen.

Zwei planparallele Glaströge von gleichen Dimensionen wurden mit je 3 ccm einer Tyrosinlösung und 3 ccm stark wirksamer Fermentlösung beschickt. Zu der einen Probe wurde 0,3 ccm des Normalserums, zu der anderen die gleiche Menge des Immunserums gefügt und nunmehr der zeitliche Ablauf der Melaninbildung in beiden Trögen verglichen. Die Berechnung der Verhältniszahlen geschah auch hier in einfacher Weise mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten.

[1]) l. c.

11h Beginn des Versuches	Normal-serum	Immun-serum
Gebildete Melaninmenge 11h 15 bis 11h 20 . . .	0,086	0,192
„ „ 11h 30 bis 11h 50 . . .	0,248	0,212
„ „ 11h 50 bis 12h 15 . . .	0,300	0,336
„ „ 12h 15 bis 12h 50 . . .	0,424	0,440
Summe	1,058	1,180

Von einer Hemmungswirkung des „Immunserums", also von einem Gehalte desselben an Antityrosinase war demnach bei diesem einen Versuche, trotz der sehr großen Menge wirksamer Tyrosinaselösung, welche das Tier erhalten hatte, nichts wahrzunehmen.

3. Künstliche Melanine und ihre Beziehung zu den natürlichen melanotischen Pigmenten.

1. Es schien uns nunmehr im Interesse einer Klärung der Melaninfrage vor allem anderen notwendig, die Beschaffenheit der durch Fermentwirkung entstehenden künstlichen Melanine mit derjenigen natürlich vorkommender melanotischer Pigmente zu vergleichen. Es war dies um so mehr geboten, als die einzige in dieser Richtung vorliegende orientierende Analyse (v. Fürth und Schneider[1]) seinerzeit mit einer ungenügenden Menge von Material (durch Einwirkung der Tyrosinase des Lepidopterenblutes auf Tyrosin gewonnen) ausgeführt worden ist, und die seinerzeit angewandten Reinigungsprozeduren nach unseren nunmehrigen Erfahrungen keineswegs ausreichend erscheinen, um eine Verunreinigung des Melanins mit Eiweiß mit Sicherheit auszuschließen.

Die Darstellung einer zur Analyse ausreichenden Menge künstlichen Melanins durch Einwirkung von Pilztyrosinase auf Tyrosin war mit großen praktischen Schwierigkeiten verbunden. Die absoluten Melaninmengen, die bei den Versuchen in Betracht kamen, sind nämlich tatsächlich sehr gering. Es kann ein Melaninquantum, welches genügt, um eine größere Menge Tyrosinlösung in eine tintenschwarze Flüssigkeit zu verwandeln, sich nach Abscheidung des Farbstoffes in Flockenform, nach Reinigung und Trocknung als praktisch kaum wägbar herausstellen; dazu kommt, daß die voluminösen Fällungen sehr viel organische und anorganische Verunreinigungen einzuschließen pflegen. Trotzdem wir die (bei den im vorigen Abschnitt beschriebenen Serienversuchen entstandenen)

[1]) l. c.

Melaninniederschläge sorgfältig gesammelt hatten, bedurfte es einer Verarbeitung von 30 bis 40 kg der Schwämme (Agaricus campestris und melleus), um Material für Doppelanalysen und einige orientierende Versuche zu gewinnen. (Dergleichen Versuche, im Herbst mit den anscheinend viel fermentreicheren Russulaarten ausgeführt, dürften sich allerdings etwas bequemer gestalten.)

Die bei verschiedenen Versuchen erhaltenen Melaninsuspensionen wurden vereinigt, am Wasserbade eingeengt, durch Zentrifugieren von anhaftendem Wasser und Glycerin befreit, wiederholt mit Wasser ausgewaschen, sodann 2 Stunden lang mit rauchender Salzsäure gekocht, der Rückstand mit Hilfe der Zentrifuge abgetrennt, gründlich mit Wasser gewaschen und überdies ausgekocht, mit Alkohol erst in der Kälte, dann am Rückflußkühler, sodann mit Äther behandelt und bei 95° zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Trotz der eingreifenden Reinigung mit rauchender Salzsäure enthielt das Präparat noch erhebliche Mengen anorganischer Asche, die nicht beseitigt werden konnte und in Rechnung gebracht werden mußte.

2. Die Analysen, auf aschefreie Substanz berechnet, ergeben:

	I.	II.	Mittel
C	52,68 Proz.	52,87 Proz.	52,77 Proz.
H	4,22 „	4,10 „	4,16 „
N	7,55 „	7,69 „	7,62 „
O	—	—	35,45 „
			100,00 Proz.

Die aus dem Analysenmittel auf den Stickstoff als Einheit bezogene Atomrelation beträgt $C_{8,2}H_{7,7}N_1O_{4,1}$.

Zum Vergleiche sei angeführt, daß der Zusammensetzung des Tyrosins ($C_9H_{11}NO_3$) die Werte C 59,67 Proz., H 6,07 Proz., N 7,73 Proz., O 26,53 Proz. entsprechen.

Es ergibt sich, daß es sich bei der Umwandlung des Tyrosins in Melanin durch Tyrosinasewirkung um einen Kondensationsvorgang handelt, bei dem das Verhältnis zwischen Kohlenstoff und Stickstoff, wenn überhaupt, so sicherlich nur wenig verschoben wird, jedenfalls aber die relative Abnahme des Wasserstoffs unter gleichzeitiger Aufnahme von Sauerstoff im Vordergrunde steht.

Es stimmt dieser Befund mit den Angaben Ducceschis [1]) überein, der durch vorsichtige Oxydation von Tyrosin mit chlor-

[1]) V. Ducceschi, Sulla natura delle Melanine a di alcune sostanze ad esse affini. — Rend. della R. Accad. dei Lincei X, 1. sem., serie 5, Fasc. 5, 1901. — Vgl. auch das Sammelreferat: Sulle Melanine, Arch. di fis. I, 6, 621 (1904).

saurem Kali in salzsaurer Lösung eine melaninartige (allerdings in Alkali leicht lösliche) Substanz erhielt, in der die Relation C:N ebenfalls von derjenigen des Tyrosins nicht erheblich abwich. (Zusammensetzung: C 52,19 Proz., H 4,75 Proz., N 6,43 Proz.)

3. Was nunmehr die Eigenschaften des künstlichen Melanins betrifft, konnte folgendes festgestellt werden.

Es war unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther und in anderen indifferenten Lösungsmitteln, in starker Natronlauge und (selbst bei anhaltendem Kochen) in rauchender Salzsäure.

Eine Probe wurde mit rauchender Salpetersäure erwärmt, bis die Entwickelung roter Dämpfe aufgehört hatte. Die klare, braunrote Lösung gab beim Eingießen in Wasser einen lehmfarbenen, flockigen Niederschlag, der sich bei Zusatz von Aceton, sowie eines Gemenges von Alkohol und Essigäther klar löste.

Eine Probe wurde ferner 3 Stunden lang mit Ätzkali im Ölbade geschmolzen. Die erkaltete Schmelze erwies sich in Wasser klar löslich und war geruchlos; beim Ansäuern der braunen Lösung mit Salzsäure dagegen fiel ein reichlicher brauner Niederschlag aus („Melaninsäure") und gleichzeitig machte sich der uns von unseren früheren Versuchen her wohlbekannte charakteristische fäkulente Geruch bemerkbar. Der Melaninsäureniederschlag wurde mit Hilfe der Zentrifuge abgetrennt, und der Reihe nach mit verdünnter Salzsäure, Wasser, Alkohol und Äther gut gewaschen, getrocknet, neuerlich im Ölbade mit Kali geschmolzen, die Schmelze wieder in Wasser gelöst und mit Säure gefällt: Wiederum trat der fäkulente, für die bei der Kalischmelze des Hippomelanins auftretenden flüchtigen Fettsäuren charakteristische Geruch auf und auch hier erscheint die Herkunft der letzteren aus etwa anhaftenden Verunreinigungen durch die Versuchsanordnung ausgeschlossen.

Wir gelangen zu dem Ergebnisse, daß das durch Einwirkung der Tyrosinase auf das Tyrosin entstandene künstliche Melanin seinen qualitativen Reaktionen nach von dem natürlichen Melanin (Hippomelanin) nicht zu unterscheiden war.

4. Wir legten uns nunmehr die Frage vor: Inwieweit ist die Annahme einer fermentativen Bildung der Melanine mit dem Befunde der bei dem tiefgreifenden Abbau natürlichen Hippomelanins auftretenden Spaltungsprodukte vereinbar?

Die von uns und anderen aus Hippomelanin erhaltenen Abbauprodukte bestanden im wesentlichen aus flüchtigen Fettsäuren, Oxalsäure, Blausäure, Ammoniak, Pyrrol und kleinen Mengen

Pyridins. Alle diese Produkte, aus einer tiefgehenden Zertrümmerung des Moleküls der Muttersubstanz hervorgehend, lassen einen Rückschluß auf die Natur der ersteren kaum zu. Sind wir ja doch gewohnt, diesen Produkten beim Abbau der verschiedenartigsten stickstoffhaltigen Substanzen zu begegnen.

Das einzige einigermaßen charakteristische Abbauprodukt des Hippomelanins war leider nur in äußerst geringen Mengen erhältlich: es ist das die „phenolartige Substanz" oder richtiger gesagt: eine Substanz, die ihrem qualitativen Verhalten nach ihre Zugehörigkeit zur Phenolreihe vermuten ließ.

Weitere charakteristische Spaltungsprodukte, die von anderen Untersuchern aus Melaninen anderer Herkunft und anderer Beschaffenheit erhalten worden waren (wie Indol, Skatol, Xyliton, Methyldibutylessigsäure) haben wir beim Hippomelanin vermißt.

Wir müssen uns also darauf beschränken, festzustellen, daß wir beim Abbau des Hippomelanins bisher kein Produkt angetroffen haben, das mit der Hypothese einer fermentativen Bildung des Hippomelanins aus Tyrosin oder einem anderen cyklischen Komplex des Eiweißmoleküls unvereinbar wäre.

5. Es erübrigt nunmehr, die analytische Zusammensetzung der Melanine von dem Gesichtspunkte der genannten Hypothese aus zu erörtern.

Was zunächst die Frage der Zugehörigkeit von Schwefel und Eisen zum Melaninmolekül betrifft, so ist bereits früher der eine[1]) von uns zu der Annahme gelangt, daß weder der Schwefel, noch das Eisen für die Vorgänge der Melaninbildung unentbehrlich sind. „Das Melaninmolekül enthält aber reaktionsfähige Atomgruppen, welche es befähigen, sich mit gewissen Schwefel- bzw. eisenreichen Komplexen zu verbinden. Die ersteren sind als Bausteine des Eiweißmoleküls im Organismus weit verbreitet; die letzteren sind zum mindesten in manchen Organen reichlich vorhanden, derart, daß man die Angliederung derartiger accessorischer Gruppen an das Melanin oder an Vorstufen desselben sehr wohl verstehen könnte, es wäre denn, daß man die etwas erzwungene Annahme vorzieht, daß schwefel- und eisenhaltige Verbindungen den Melaninen als hartnäckig festgehaltene Verunreinigungen mechanisch anhaften."

[1]) v. Fürth, Physiologische und chemische Untersuchungen über melanotische Pigmente (Sammelreferat). Zentralbl. f. pathol. Anatomie 15, 636 (1904).

Nun ist speziell das Hippomelanin, wie wir in Übereinstimmung mit Berdez und Nencki[1]) gefunden haben, tatsächlich eisenfrei.

Was den Schwefel betrifft, ist es uns nicht gelungen, denselben beim schrittweisen Abbau des Hippomelanins ganz zu entfernen:

Schwefelgehalt des Hippomelanins (Berdez u. Nencki) .	2,76 bis 2,98 Proz.
Produkt durch Einwirkung von Salpetersäure erhalten . .	1,12 „
Produkt durch Kombination von Kalischmelze und Chromsäureoxydation erhalten	0,71 bis 1,03 „

Immerhin aber vermochten wir durch Einwirkung von Salpetersäure, bzw. durch Kombination von Chromsäureoxydation mit der Kalischmelze den Schwefelgehalt des Pigments auf ein Drittel bis ein Viertel des ursprünglichen Wertes zu reduzieren, derart, daß sich die Vorstellung aufdrängt, der Schwefel gehöre, wenn überhaupt dem Pigmentmoleküle als solchem, so doch nicht dem „Kerne“ desselben an. Auch sei hier an den wichtigen Befund Spieglers[2]) über das Vorkommen elementaren Schwefels in Haar- und Cuticularpigmenten erinnert.

Vergleichen wir nunmehr die analytische Zusammensetzung jener Produkte, die wir erhalten, wenn wir erst Hippomelanin durch Kalischmelze in Melaninsäure überführen und diese dann schrittweise mit Chromsäure weiter abbauen, mit derjenigen des künstlichen Melanins:

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.	O Proz.	Atomrelation
Hippomelanin	54,60	3,87	10,67	2,84	28,02	$C_{6,0}H_{5,1}N_1O_{2,3}$
Melaninsäure	59,93	3,88	10,41	2,59	23,19	$C_{6,7}H_{5,2}N_1O_{2,0}$
Niederes Oxydationsprodukt	58,04	2,92	8,79	1,06	29,19	$C_{7,7}H_{4,7}N_1O_{2,9}$
Höheres Oxydationsprodukt .	53,98	3,01	6,93	0,71	(35,37)	$C_{9,2}H_{6,0}N_1O_{4,5}$
Künstliches Melanin	55,77	4,16	7,62	—	35,45	$C_{8,5}H_{7,7}N_1O_{4,1}$

Ohne die Tatsache aus den Augen zu verlieren, daß keines der analysierten Produkte die Kriterien chemischer Reinheit und Einheitlichkeit besitzt, der Wert von dergleichen Analysen also nur ein beschränkter sein kann, geben uns die vorliegenden Zahlen doch eine gewisse Orientierung über die Richtung, in welcher sich der schrittweise Abbau des Melanins vollzieht und lassen uns

[1]) Berdez und Nencki, l. c.
[2]) Spiegler, l. c.

soviel entnehmen, daß mit fortschreitender Oxydation das Verhältnis C:N wächst und sich der Relation des künstlichen Melanins bzw. des Tyrosins (1:9) nähert.

Ohne also den Wert derartiger Beobachtungen irgendwie überschätzen zu wollen, glauben wir doch, im Zusammenhalt mit der Gesamtheit der mitgeteilten Tatsachen, darin eine Stütze für die Vermutung sehen zu dürfen, daß sozusagen der „Kern" des wahrscheinlich sehr großen Hippomelaninmoleküls dem künstlichen Melanin ähnlich beschaffen sei und daß dieser Kern um so deutlicher zutage trete, je vollständiger die demselben anhaftenden accessorischen Gruppen durch chemische Angriffe beseitigt werden.

Wenn also biologische Beobachtungen über die Koexistenz von Tyrosinasen und melanotischen Pigmenten einerseits, Erfahrungen über die Natur künstlicher Melanine andererseits, die Hypothese einer fermentativen Bildung der natürlichen Melanine im allgemeinen wahrscheinlich gemacht haben, so sind durch die chemischen Untersuchungen über das Hippomelanin und seine Abbauprodukte zum mindesten keine Tatsachen zutage gefördert worden, welche mit dieser Vorstellung unvereinbar wären.

Um Mißverständnissen vorzubeugen, sei jedoch ausdrücklich erwähnt, daß wir nicht etwa ausschließlich das Tyrosin als Muttersubstanz der natürlichen Pigmente ansehen, sondern auch andere im Stoffwechsel auftretende zyklische Komplexe dabei in Betracht ziehen möchten. Lehrt ja doch die physiologische Erfahrung, daß selbst an sich relativ schwer oxydable Substanzen im Organismus unter Aufnahme von Hydroxylen leicht oxydabel werden können (so z. B. beim Übergange von Phenylalanin in Homogentisinsäure) und sind wichtige Bausteine des Eiweißmoleküls, wie das Tryptophan, das Histidin, die Pyrrolidin- und Oxypyrrolidincarbonsäure von diesem Gesichtspunkte aus überhaupt noch kaum studiert worden.

Zusammenfassung.

1. Das Pigment melanotischer Lymphdrüsentumoren des Pferdes (Hippomelanin) ist durch seine außerordentlich große Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen Eingriffen und durch seine Unlöslichkeit selbst in konzentrierten Alkalilaugen von anderen Melaninen, so insbesondere von den Pigmenten epidermoidaler Gebilde sowie von dem Farbstoffe maligner melanotischer Tumoren (Phymatorhusin) wohl unterschieden.

2. Bei Spaltung des durch andauerndes Kochen mit rauchender Salzsäure, sowie durch Kalischmelze von jeder Eiweißbeimengung befreiten Farbstoffs wurden im wesentlichen nur von einer tiefgehenden Zertrümmerung des Pigmentmoleküls herrührende Produkte (flüchtige Fettsäuren, Oxalsäure, Blausäure, Ammoniak, Pyrrol, Pyridin) neben geringen Mengen einer in ihrem qualitativen Verhalten mit den Phenolen übereinstimmenden Substanz erhalten. Gewisse charakteristische, von anderen Untersuchern aus Melaninen anderer Herkunft erhaltene Spaltungsprodukte, wie Indol, Skatol, Xyliton, Methyldibutylessigsäure wurden beim Abbau des Hippomelanins vermißt.

3. Das Hippomelanin ist eisenfrei. Sein Schwefelgehalt wird durch Behandlung des Farbstoffs mit Salpetersäure und Chromsäure auf einen Bruchteil des ursprünglichen Wertes reduziert. Er scheint daher nur accessorischer Natur zu sein.

4. Durch Kombination von Kalischmelze und Chromsäureoxydation wird im Hippomelanin das Atomverhältnis zwischen Stickstoff und Kohlenstoff (ursprünglich etwa 1:6) zugunsten des Kohlenstoffs derart verschoben, daß es sich der Relation des künstlichen Melanins bzw. Tyrosins (1:9) nähert.

5. Die Umwandlung des Tyrosins in künstliches Melanin unter der Einwirkung pflanzlichen Tyrosinaseferments erfolgt unter Abgabe von Wasserstoff und Aufnahme von Sauerstoff ohne eine wesentliche Verschiebung des Verhältnisses zwischen Stickstoff und Kohlenstoff.

6. Das künstliche Melanin zeigt in seinen Eigenschaften (Widerstandsfähigkeit gegenüber chemischen Eingriffen, Auftreten fäkulent riechender flüchtiger Fettsäuren und von „Melaninsäure" bei der Kalischmelze, charakteristisches Verhalten gegen Salpetersäure) mit dem Hippomelanin weitgehende Übereinstimmung.

7. Zum Zwecke quantitativer Untersuchungen über die Fermentkinetik der Tyrosinase wurden zwei Verfahren ausgearbeitet, von denen das eine auf einer volumetrischen Messung von Melaninniederschlägen mit Hilfe der Zentrifuge, das andere auf der Methode spektrophotometrischer Messung beruht.

8. Mit Hilfe dieser Methoden wurde der Einfluß verschiedener Faktoren physikalischer und chemischer Art (Temperatur, Alkaleszenz, Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd und metallischen Katalysatoren, Konzentration des Tyrosins und des Ferments) auf die Wirkung pflanzlicher und tierischer Tyrosinase (aus Agaricusarten und der Lepidopterenhämolymphe) genauer untersucht. Das

Studium der Beziehungen zwischen der Fermentmenge und dem Quantum gebildeten Melanins ergab bei der Pilztyrosinase mit großer Regelmäßigkeit die auffällige Erscheinung einer Überschußhemmung; bei der tierischen Tyrosinase fand sich zwar keine solche, wohl aber die Tatsache, daß von einem gewissen Punkte angefangen ein Mehrzusatz von Ferment die Menge gebildeten Melanins nicht mehr wesentlich vermehrte.

9. Injektion von Lepidopterentyrosinase vermochte bei einem Kaninchen keine Bildung von Antityrosinase im Blutserum hervorzurufen (spektrophotometrische Feststellung).

10. Die chemische Untersuchung des Hippomelanins hat keine Tatsache zutage gefördert, welche mit der durch zahlreiche biologische Tatsachen (verbreitetes Vorkommen von Tyrosinase in melaninproduzierenden Geweben verschiedenster Art bei Wirbeltieren und Wirbellosen) gestützten Hypothese einer fermentativen Bildung von Melanin durch Einwirkung von Tyrosinasen auf cyklische (aus dem Eiweißmolekül stammende) Komplexe unvereinbar wäre.

Wien, März 1907.

VIII.

Über die chemische Stellung der Pankreasnucleïnsäure (Guanylsäure).

Von Prof. Dr. **Otto v. Fürth,**
Assistenten am physiologischen Institut der Universität in Wien,

und cand. med. **Ernst Jerusalem.**

Bekanntlich gehört das Studium der Nucleïnsäuren zu den schwierigsten und verwickeltsten Aufgaben der physiologischen Chemie. Um so erfreulicher ist die Tatsache, daß die Forschungen der letzten Jahre zu einer wesentlichen Vereinfachung und Klärung der Anschauungen auf diesem Gebiete geführt haben. Es hat sich insbesondere gezeigt, daß die tierischen Nucleïnsäuren, wenn rein dargestellt, einander alle in ihrer Zusammensetzung und in ihren Eigenschaften so nahe stehen, daß sie ungezwungen den Thymonucleïnsäuren angereiht werden können [1]).

Nur eine einzige Nucleïnsäure unterscheidet sich nach den vorliegenden Angaben sehr wesentlich von allen anderen Nucleïnsäuren; es ist die von Bang [2]) beschriebene Guanylsäure aus dem Pankreas [3]).

Bang fand, daß diese Nucleïnsäure bei der hydrolytischen Spaltung glatt in vier Moleküle Guanin, drei Moleküle Pentose, drei Moleküle Glycerin und vier Moleküle Phosphorsäure zerfällt. „Abgesehen von der Tatsache", sagt Bang, „daß hierdurch zum

---

[1]) Vgl. die zusammenfassende Darstellung von Hammarsten in der neuesten (VI.) Auflage seines Lehrbuches der physiologischen Chemie 1907, S. 153 ff.

[2]) I. Bang, Die Guanylsäure des Pankreas und ihre Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 133 (1898). — Derselbe, Chemische und physiologische Studien über die Guanylsäure. Ebenda 31, 411 (1900). — Derselbe und C. A. Raaschou, Über die Darstellung der Guanylsäure. Diese Beitr. 4, 175 (1904).

[3]) Die von manchen Autoren den Nucleïnsäuren zugezählte Inosinsäure lassen wir außerhalb des Kreises unserer Betrachtungen, da ihre chemische Stellung vorderhand noch unaufgeklärt ist.

erstenmal eine Nucleïnsäure vollständig untersucht und beschrieben worden ist, haben wir bewiesen: 1. Die Guanylsäure enthält nur eine Xanthinbase; aller Stickstoff wird von dem Guanin geliefert. 2. Die Guanylsäure enthält eine Pentosegruppe... Niemand kann jetzt an der Existenz der Pentose im Pankreasnucleoproteïd und in der Guanylsäure zweifeln. 3. Die Guanylsäure enthält Glycerin, das als Glycerinphosphorsäure vorkommt. Die Guanylsäure bekommt dadurch ein besonderes Interesse. Sie stimmt nämlich mit dem Lecithin sehr überein. Beide haben als Kern Glycerinphosphorsäure, welche im Lecithin mit Fettsäure und Cholin verbunden ist, in der Guanylsäure aber mit Zucker und Guanin. Es ist auch nicht unwahrscheinlich, daß diese Substanzen miteinander verwandt sind. Lecithin wird ja allgemein als Baumaterial der Nucleoproteïde bzw. Nucleïnsäuren angesehen. Während sonst die Lecithine bis zum Phosphor gespalten werden, bleibt hier die ganze Glycerinphosphorsäure zum Aufbau der Guanylsäure angewandt....“

Bang betont, daß in der Guanylsäure auf vier Phosphoratome 20 Stickstoffatome kommen, in anderen Nucleïnsäuren dagegen nur 14 bis 15 Stickstoffatome. Er hebt hervor, daß sie im Gegensatze zu den anderen Nucleïnsäuren eine schwache Säure und schon durch Essigsäure fällbar sei. Er stellt ferner für ihre Konstitution die Formel auf

$$
\begin{array}{c}
HO \diagdown \diagup OH \\
C_5H_4N_5.O—P—O.C_3H_5(OH).C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5.O—P—O.C_3H_5(OH).C_5H_9O_5 \\
O \diagup\diagdown O \\
\diagdown\diagup \\
C_5H_4N_5.O—P—O.C_3H_5(OH).C_5H_9O_5 \\
| \\
O \\
| \\
C_5H_4N_5.O—P—OH \\
OH \diagup \diagdown OH
\end{array}
$$

und spricht schließlich die Meinung aus, daß die Erforschung der Guanylsäure in chemischer Beziehung zu Ende geführt sei.

Nun liegen aber bereits Angaben anderer Autoren vor, welche zu denjenigen Bangs in Widerspruch stehen. Es sind dies die

Mitteilungen von Levene[1]) und Stookey[2]), sowie die von Jones und Whipple[3]), aus denen das Vorkommen von Adenin, sowie von Pyrimidinbasen unter den Spaltungsprodukten der Nucleïnsäure bzw. des Nucleoproteïdes aus Pankreas hervorgeht. Auch konnte Levene bei der Hydrolyse seiner Nucleïnsäure weder eine reduzierende Substanz noch Glycerin nachweisen. Die Frage der Konstitution der Guanylsäure kann also sicherlich nicht im Sinne Bangs für abgeschlossen gelten.

Die unmittelbare Veranlassung zur Aufnahme dieser Frage bot uns die vor kurzem erschienene, den Glyceringehalt des Blutes betreffende Mitteilung von Tangl und Weiser[4]). Die genannten Autoren haben den Glyceringehalt des Blutes nach einem sehr exakten Verfahren bestimmt, welches in letzter Linie auf eine Methoxylbestimmung nach Zeisel hinausläuft. Die Verwendbarkeit derselben zur Glycerinbestimmung in anderen Flüssigkeiten ist bereits früher von Zeisel und Fanto festgestellt worden. Die Methode beruht auf der Überführung von Glycerin durch siedende Jodwasserstoffsäure in Isopropyljodid, welches in Silbernitratlösung aufgefangen wird und eine Berechnung der Glycerinmenge aus dem gebildeten Jodsilber gestattet.

Da also nunmehr eine Methode gegeben war, um selbst sehr geringe Glycerinquantitäten in einem Gemenge organischer Substanzen mit großer Genauigkeit zu bestimmen, schien uns die Aufgabe, die Pankreasnucleïnsäure auf ihren Gehalt an Glycerin zu prüfen, um so dringender, als ja die Möglichkeit gegeben war, daß das Glycerin, welches Bangs so bestimmt lautenden Angaben zufolge einen wichtigen Baustein der Guanylsäure bilden soll, auch in anderen Nucleïnsäuren vorkomme. War ja doch bisher der sichere Nachweis sehr kleiner Glycerinmengen außerordentlich schwierig gewesen.

Da wir, wie vorausschickend bemerkt sei, Bangs Angaben über diesen Gegenstand nicht zu bestätigen vermochten, haben

[1]) P. A. Levene, Darstellung und Analyse einiger Nucleïnsäuren. Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 540 (1901); 37, 402 (1903); 41, 4 (1903); 43, 199 (1904).

[2]) P. A. Levene und L. B. Stookey, Notiz über das Pankreasnucleoproteïd. Ebenda 41, 404 (1904).

[3]) W. Jones and G. H. Whipple, The Nucleproteid of the suprarenal gland (from the laboratory of Physiological Chemistry, John Hopkins Univ.); Amer. Journ. of Physiol. 7, 424 (1902).

[4]) F. Tangl und H. Weiser, Über den Glyceringehalt des Blutes nach Untersuchungen mit dem Zeiselschen Jodidverfahren (Tierphysiologische Versuchsstation in Budapest). Pflügers Arch. 115, 152 (1906).

wir uns veranlaßt gesehen, einige weitere Versuche über den Pentosengehalt, die quantitative Zusammensetzung, sowie die Basen der Pankreasnucleïnsäure anzuschließen, um über die Stellung derselben anderen, genauer bekannten Nucleïnsäuren gegenüber ins klare zu kommen.

1. Glyceringehalt.

Wir stellten aus 1 kg Ochsenpankreas genau nach dem Verfahren von Bang und Raaschou[1]) Guanylsäure dar und verarbeiteten das in einer Ausbeute von 0,7 g gewonnene, überdies durch Ätherextraktion im Soxhletapparate von jeder Fettbeimengung befreite Präparat nach Bangs Vorgange auf Glycerin.

Bang[2]) verfuhr nun derart, daß er 0,4 g seiner durch Alkohol und Äther von Fett befreiten Guanylsäure mit 100 ccm 5 proz. Schwefelsäure drei Stunden auf dem Wasserbade kochte, sodann mit 10 g Magnesia destillierte. Der Rückstand wurde mit Alkohol ausgezogen und das nach langsamen Abdunsten des Alkohols erhaltene Residuum nach König weiter auf Glycerin untersucht. „Es wurde mit Quarzsand und Kalkmilch eingedampft und dann mit heißem absoluten Alkohol extrahiert. Das alkoholische Filtrat wurde nach 24 Stunden filtriert, das neue Filtrat vorsichtig eingedampft und aufs neue mit absolutem Alkohol extrahiert. Der Alkohol wurde mit Äther versetzt und nach einigen Stunden filtriert. Der Ätheralkohol wurde verjagt und es blieb ein Sirup zurück."

Dieser Sirup zeigte nun nach Bang folgende Eigenschaften: 1. Er schmeckte süß, ohne alkalische Kupferoxydlösung zu reduzieren; 2. er gab beim Erhitzen mit Kaliumhydrosulfat die Akroleïnreaktion ohne gleichzeitige Verkohlung; 3. er gab eine grüne Boraxperle; 4. bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung trat Oxalsäure auf. Aus diesem Verhalten glaubte Bang auf das Vorhandensein von Glycerin schließen zu sollen.

Bei Wiederholung dieses Vorganges erhielten wir nun einen minimalen Rückstand, der weder sirupös war, noch süß schmeckte, noch auch Akroleïnreaktion, noch aber, wie ja selbstverständlich, eine grüne Boraxperle gab.

Bezüglich der Deutung jener Reaktionen, welche Bang als für Glycerin charakteristisch aufgefaßt hat, ist übrigens zu bemerken, daß das Auftreten von Oxalsäure bei der Permanganatoxydation ja nichts anderes beweist, als das Vorhandensein organischer Sub-

---

[1]) l. c.

[2]) l. c. Zeitschr. f. phys. Chemie 31, 422.

stanz im allgemeinen, und daß eine Grünfärbung der Boraxperle (falls der genannte Autor sich nicht etwa nur ungenau ausgedrückt und nicht tatsächlich eine grüne Flammenfärbung beobachtet hat) nur von einer anorganischen Beimengung verursacht gewesen sein kann. Denn für die Gegenwart von Glycerin wäre nicht die Grünfärbung der Boraxperle, sondern der umgebenden Flamme charakteristisch gewesen [1]).

Um uns jedoch über die An- oder Abwesenheit des Glycerins unter den Spaltungsprodukten der Pankreasnucleïnsäure völlige Gewißheit zu verschaffen, stellten wir, wie vorhin, eine zweite Portion Guanylsäure nach Bangs Verfahren aus Rindspankreas dar. 0,8 g des mit Äther extrahierten Präparates wurden 3 Stunden lang im Wasserbade mit 5proz. Schwefelsäure unter Rückflußkühlung erhitzt, die Flüssigkeit mit einem Überschuß von Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag filtriert und mit säurehaltigem Wasser gewaschen, das Filtrat durch Barytwasser von Schwefelsäure, sodann durch Kohlensäure vom Barytüberschusse befreit, eingedampft, der Rückstand wiederholt mit Alkohol extrahiert, die Gesamtheit der alkoholischen Auszüge, die mit Äther keine Fällung mehr gaben, eingedunstet und der Rückstand mit 5 ccm Wasser in das Kölbchen des Methoxylapparates eingebracht. Der weitere Vorgang der Glycerinbestimmung wurde genau entsprechend den Angaben von Tangl und Weiser [2]) durchgeführt. Die Bestimmung fiel vollkommen negativ aus.

Auf Grund der Bangschen Formel wäre 0,14 g Glycerin (= 17 Proz.) zu erwarten gewesen, ein Quantum, welches, wie wir uns durch Versuche überzeugt haben, bei dem Methoxylverfahren nicht nur nicht übersehen, sondern mit befriedigender Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann.

Die rechnerischen Überlegungen aber, welche Bang zu der Suche nach einem unbekannten stickstofffreien Spaltungsprodukte der Guanylsäure veranlaßt haben, sind um so weniger beweisend, als sie (s. u.) auf irrtümlichen Annahmen basieren [3]).

---

[1]) Vgl. in Beilsteins Handbuch, 3. Aufl., 1, 275: Die Angaben über den Glycerinnachweis nach Senier und Lowe.

[2]) l. c.

[3]) „War die Formel der Guanylsäure $C_{44}H_{66}N_{20}P_4O_{34}$, so haben wir unter den Spaltungsprodukten, abgesehen vom Phosphor, gefunden: $4\,C_5H_5N_5O + 3\,C_5H_{10}O_5$, zusammen 35 C und 20 N. Als Rest blieben also 9 C und kein N. Die letzten Spaltungsprodukte enthalten folglich 9 Atome C, sind aber N-frei. Es hat sich herausgestellt, daß das letzte Spaltungsprodukt der Guanylsäure Glycerin ist.“ (Bang, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 422.)

Schließlich sei noch erwähnt, daß Osborne und Harris[1]) bei Untersuchung der Spaltungsprodukte der Weizennucleïnsäure vergeblich auf Glycerin gefahndet haben.

2. Pentosengehalt.

Wie erwähnt, ist Bang der Meinung, daß ein Molekül Guanylsäure drei Moleküle Pentose enthält, und er gründet sie auf die Tatsache, daß er bei der hydrolytischen Spaltung seiner Präparate etwa 30 Proz. reduzierenden Zuckers gewann.

Wir konnten uns von der Richtigkeit der Tatsache überzeugen, daß ein nach Bang hergestelltes Präparat tatsächlich bei Säurespaltung reduzierenden Zucker liefert.

Eine andere Frage aber ist es, ob die reduzierende Pentose tatsächlich dem Nucleïnsäuremolekül als solchem angehört oder nicht.

Bereits Herlant[2]), sowie Levene[3]) haben auf die Hartnäckigkeit hingewiesen, mit der Beimengungen kolloider Kohlehydrate den Nucleïnsäurepräparaten anhaften und zur Beseitigung derselben die Fällung mit Kupferchlorid empfohlen, wobei das Kupfersalz der Nucleïnsäure niedergeschlagen wird, während Glykogen u. dgl. in Lösung bleibt.

Wir stellten nun zunächst nach dem Verfahren von Neumann ein Nucleïnsäurepräparat aus 6 kg Rinderpankreas her und erhitzten einen Teil desselben 3 Stunden lang mit 5proz. Schwefelsäure unter Rückflußkühlung am Wasserbade. In der Zersetzungsflüssigkeit konnte keine Fehlingsche Lösung reduzierende Substanz nachgewiesen werden.

Ein weiteres Präparat wurde unter Kombination des vorerwähnten Verfahrens mit der Kupferchloridmethode und zwar nach dem Vorgange dargestellt, den W. Löbisch[4]) zur Bereitung der Milchdrüsennucleïnsäure eingehalten hat. 0,2 g dieses Präparates wurden mit 10 ccm 5proz. Schwefelsäure am Wasserbade erhitzt, die braune Flüssigkeit zur Entfärbung mit Bleiessig gefällt, filtriert, der Niederschlag zweimal mit Wasser ausgekocht, das gesamte Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, stark eingeengt, nunmehr auf das Vorhandensein reduzierender Substanzen geprüft. Auch diesmal fiel die Probe negativ aus.

Wir konnten sonach in Übereinstimmung mit Levene aus der Pankreasnucleïnsäure kein reduzierendes Kohlen-

---

[1]) Osborne und Harris, Nucleïnsäure des Weizenembryo, Zeitschr. f. physiol. Chemie 36, 118 (1902).

[2]) L. Herlant, Untersuchungen ü. d. Nucleïnsäure aus unreifer Lachsmilch usw. Arch f. exp. Path. 44, 148.

[3]) Levene, l. c.

[4]) W. Löbisch, Über Nucleïnsäureeiweißverbindungen usw. Diese Beiträge 8, 195 (1906).

hydrat abspalten. Ebenso hat Kossel[1]) in der Nucleïnsäure des Lachs- und Karpfenspermas, sowie der Thymus, Bang[2]) in der letzteren, Osborne und Harris[3]) in der Tritikonucleïnsäure, Löbisch in der Milchdrüsennucleïnsäure einen hydrolytisch abspaltbaren, reduzierenden Zucker vermißt. Dementsprechend hebt denn auch Hammarsten[4]) zusammenfassend hervor, daß man, von der Guanylsäure abgesehen, aus den tierischen Nucleïnsäuren bisher kein reduzierendes Kohlehydrat erhalten habe. Auch bezüglich der Hefenucleïnsäure hat Kossel[5]) Zweifel geäußert, ob das von ihm im Hefenucleïn gefundene reduzierende Kohlenhydrat zur Nucleïnsäure als solcher gehöre, oder aber ihr etwa in derselben Weise angefügt sei, wie das Eiweiß.

Es liegt demnach bisher kein Grund vor, die Beteiligung reduzierender Kohlenhydrate am Aufbau von Nucleïnsäuren für bewiesen zu halten.

Zweifellos festgestellt ist dagegen, daß Nucleoproteïde hydrolytisch abspaltbare Kohlehydrate enthalten, und zwar ist speziell für das Pankreasnucleoproteïd die von Hammarsten[6]) darin entdeckte, später von Salkowski[7]) studierte Pentose von Neuberg[8]) als Xylose erkannt worden. Nach Grund[9]) ist das Pankreas anderen Organen gegenüber durch seinen hohen Pentosengehalt ausgezeichnet (Rindspankreas enthält 0,44 Proz. Pentose, andere Organe des Rindes nur 0,02 bis 0,10 Proz.; das Hammarstensche Nucleoproteïd besteht zu 15 Proz. aus Xylose).

Bezüglich der Stellung der Pentose im Molekül des Nucleoproteïdes ist die Beobachtung Umbers[10]) bemerkenswert, derzu-

---

[1]) Kossel, zit. nach Burian, Chemie der Spermatozoen, Erg. d. Physiol. 3, 101.

[2]) I. Bang, Chemische Untersuchung der lymphatischen Organe. Diese Beiträge 4, 115, 331, 362.

[3]) l. c.

[4]) Hammarsten, Lehrb. d. physiol. Chem., 6. Aufl. 1907, S. 152.

[5]) Kossel, Zur Abwehr, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 428 (1901).

[6]) O. Hammarsten, Zur Kenntnis der Nucleoproteïde, Zeitschr. f. physiol. Chem. 19, 19 (1893).

[7]) E. Salkowski, Über das Vorkommen von Pentosen im Harne, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 507 (1899).

[8]) Neuberg, Über die Konstitution der Pankreasproteïdpentose, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 1167 (1902).

[9]) Grund, Über den Gehalt der Organe an gebundenen Pentosen (aus dem chem. Laboratorium d. pathol. Inst. [Prof. Salkowski] Berlin), Zeitschr. f. physiol. Chemie 35, 130 (1902).

[10]) F. Umber, Über die fermentative Spaltung der Nucleoproteïde im Stoffwechsel (aus dem chem. Laboratorium d. pathol. Inst. [Prof. Salkowski] Berlin), Zeitschr. f. klin. Med. 43, 282 (1901); vgl. auch ebenda 40 (1900).

folge schon im Beginn der fermentativen Spaltung durch Trypsin oder Pepsin der Zucker völlig vom Eiweißkomplexe losgelöst wird, jedoch an der nucleïnsäurehaltigen Gruppe haften bleibt. Umber bemerkt in bezug auf die letztere: „Sie reduziert alkalische Kupferlösung, wobei die Kupferoxydulbildung durch den Niederschlag mit Rhodankalium und Ferrocyankalium in salzsaurer Lösung nachgewiesen werden kann. Direkte Osazonbildung ohne vorherige Säurespaltung kann aber nicht erzielt werden."

Vielleicht liegt in diesen Beobachtungen die Erklärung für den Widerspruch, der zwischen Levenes und unseren Befunden einerseits, denjenigen Bangs andererseits besteht: Bei dem Darstellungsverfahren Bangs bleibt eben der Pentosenkomplex locker an der Nucleïnsäure haften, während er bei den von Levene und uns angewandten Reinigungsmethoden von ihm losgetrennt wird.

Von diesem Pentosenkomplexe, der bei der hydrolytischen Spaltung reduzierenden Zucker liefert, ist jene Gruppe des Nucleïnsäuremoleküls aufs schärfste zu unterscheiden, welche einerseits, wie die Untersuchungen Kossels und seiner Schüler gelehrt haben, bei der Säurespaltung Lävulinsäure liefert und sich andererseits durch eine Reihe charakteristischer Farbenreaktionen verrät. Es unterliegt keinem Zweifel, daß diese Reaktionen auch jenen Nucleïnsäuren zukommen, welche von jeder Zuckerbeimengung befreit sind und bei der Hydrolyse kein reduzierendes Kohlehydrat mehr liefern.

Speziell aus der Pankreasnucleïnsäure hat Levene[1]) Lävulinsäure erhalten, und wir konnten uns überzeugen, daß unsere einwandfrei gereinigten Präparate schöne Farbenreaktionen bei der Naphthol- und Orcinprobe gaben.

Um ferner über die Menge des durch Einwirkung starker Säure aus der Nucleïnsäure erhältlichen Furfurols einen Aufschluß zu erhalten, gingen wir nach dem Verfahren von Grund[2]) derart vor, daß wir die Nucleïnsäure mit wiederholt erneuter Salzsäure vom spez. Gew. 1,06 so lange destillierten, als im Destillate noch Furfurol durch die Farbenreaktion mit Naphthol nachweisbar war. Das Destillat wurde mit einer Lösung von Phloroglucin in Salzsäure versetzt, der nach einem Tage abgesetzte Niederschlag auf ein gewogenes Filter gebracht, gewaschen, getrocknet und gewogen.

0,9841 g reiner Pankreasnucleïnsäure nach Neumanns Verfahren dargestellt, gaben 0,0681 g Furfurolphloroglucid, entsprechend 2,9 Proz. Furfurol.

---

[1]) P. A. Levene, Darstellung und Analyse einiger Nucleïnsäuren, siebente Mitteilung. — Zeitschr. f. physiol. Chemie 43, 199 (1904).

[2]) Grund, l. c.

0,7216 g reinen Kupfersalzes der Pankreasnucleïnsäure gaben 0,0388 g Phloroglucid, entsprechend 2,6 Proz. Furfurol (bezogen auf die freie Nucleïnsäure).

Des Vergleiches wegen wurden zwei weitere Versuche mit Hefe- und Milznucleïnsäure ausgeführt.

1,2991 g des Kupfersalzes der Hefenucleïnsäure (aus einem von G. Grübler bezogenen Präparate durch Fällung mit Kupferchlorid und Reinigung desselben nach Schmiedebergs Methode dargestellt) gaben 0,027 g Furfurolphloroglucid, entsprechend 1 Proz. Furfurol.

1,2392 g des Kupfersalzes der Milznucleïnsäure (nach einer Kombination des Neumannschen und des Kupferchloridverfahrens dargestellt) gaben 0,1073 g des Phloroglucids, entsprechend 5 Proz. Furfurol.

Damit ist also der Beweis geliefert, daß die Pankreasnucleïnsäure auch bezüglich ihres Vermögens, unter der Einwirkung starker Mineralsäuren Furfurol abzuspalten, anderen tierischen Nucleïnsäuren gegenüber keineswegs eine Ausnahmestellung einnimmt, die etwa auf einen hohen Pentosengehalt hindeuten könnte.

Anders dagegen scheinen sich gewisse pflanzliche Nucleïnsäuren zu verhalten. So erhielten bei analogem Vorgehen Osborne und Harris[1]) viel größere Furfurolausbeuten (0,25 bis 0,29 g Phloroglucid aus 1 g der Nucleïnsäure).

Angesichts der Tatsache, daß (vgl. Grunds Versuche[2]) auch Hexosen unter Umständen kleine Furfurolmengen liefern können, erscheint es zweifelhaft, ob man neben dem lävulinsäureliefernden Komplexe denn überhaupt noch eine festgebundene, nicht in reduzierender Form abspaltbare Pentose als Quelle des Furfurols im Moleküle tierischer Nucleïnsäure annehmen müsse. Die fertige Lävulinsäure als solche ist allerdings, wie wir uns überzeugt haben, zur Furfurolbildung nicht mehr befähigt. Es wäre aber denkbar, daß die lävulinsäurebildende Gruppe in höherem Grade zur Furfurolbildung geeignet ist als die typischen Hexosen. In diesem Falle würde sich die Frage der Kohlehydratgruppen in tierischen Nucleïnsäuren dahin vereinfachen, daß die Pentose ganz außerhalb des Gefüges der Nucleïnsäuren steht und diese letzteren nur den lävulinsäurebildenden Hexosenkomplex Kossels enthalten. Diese Frage bleibt sonach vorderhand offen.

3. Basengehalt.

Angesichts der eingangs erwähnten Angaben von Levene, Jones und ihren Mitarbeitern über das Vorkommen von Adenin,

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.

Thymin, Cytosin und Uracil unter den Spaltungsprodukten aus dem Pankreas dargestellter Nucleoproteïde und Nucleïnsäuren erscheint die Angabe Bangs, die Guanylsäure enthalte von basischen Produkten nur Guanin, von vornherein sehr unwahrscheinlich.

Es bliebe für dieselbe nur die Erklärung übrig, daß das Pankreas etwa zwei Nucleïnsäuren enthalte, von denen die eine den gewöhnlichen Charakter der Thymonucleïnsäuren trägt, die andere aber der „Guanylsäure" entspricht.

Um auch diese Möglichkeit experimentell zu prüfen, gingen wir folgendermaßen vor:

1,1249 g Guanylsäure, unter genauer Einhaltung der Vorschriften von Bang und Raaschou[1]) hergestellt, wurden zum Zwecke der Bestimmung des Basengehaltes nach dem Verfahren von Burian und Hall[2]) mit 20 ccm 1 proz. Schwefelsäure auf dem Sandbade unter Rückflußkühlung 8 Stunden lang gekocht. Hierauf wurde Barytwasser bis zum Eintritt alkalischer Reaktion hinzugefügt, der Baryumsulfatniederschlag dreimal mit Wasser ausgekocht, Filtrat und Waschwasser vereinigt, durch Kohlensäure vom Barytüberschusse befreit, das Baryumcarbonat abfiltriert, mit heißem Wasser nachgewaschen, die Flüssigkeit mit Essigsäure angesäuert, mit einer Mischung konzentrierter Natronlauge und gesättigter Natriumcarbonatlösung alkalisch gemacht, der minimale Baryumcarbonatniederschlag abfiltriert, mit warmem Wasser nachgewaschen, mit Salzsäure angesäuert und mit Ammoniak übersättigt. Nunmehr wurde mit ammoniakalischer Silberlösung ausgefällt, der Purinbasenniederschlag (Hauptfällung) abfiltriert, mit verdünntem Ammoniak, sodann mit heißem Wasser gewaschen.

Das Filtrat wurde mit Essigsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom Silber befreit, eingeengt, filtriert, mit heißem Wasser nachgewaschen, aufgekocht, mit Bleiessig versetzt (wobei jedoch kein Niederschlag ausfiel), mit Schwefelwasserstoff entbleit, mit heißem Wasser nachgewaschen, stark eingeengt und neuerlich mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt (Korrekturfällung der Purinbasen), die sehr spärliche Fällung mit der Purinbasenhauptfällung vereinigt und nochmals mit ammoniakhaltigem, sodann mit heißem Wasser gewaschen.

Der Purinbasenniederschlag wurde sodann in salzsäurehaltigem Wasser suspendiert, so lange am Wasserbade erwärmt, bis sich das Chlorsilber gut abgesetzt hatte, filtriert, mit salzsäurehaltigem Wasser nachgewaschen, die Flüssigkeit nunmehr mit Ammoniak alkalisch gemacht, der ausfallende Guaninniederschlag auf einem gewogenen Filter gesammelt, mit ammoniakalischem Wasser gewaschen, getrocknet und gewogen (A).

Das Filtrat wurde stark eingeengt. Proben ergaben weder mit Ammoniak noch aber mit Metaphosphorsäure (welche nach Pohl selbst sehr verdünnte Guaninlösung fällt) irgend eine Fällung, erwiesen sich sonach als guaninfrei. Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde nunmehr mit ammonia-

[1]) l. c.
[2]) Zeitschr. f. physiol. Chemie 38, 336.

kalischer Silberlösung ausgefällt, der voluminöse Niederschlag (B) auf gewogenem Filter gesammelt, gewaschen, getrocknet und gewogen.

Da nach den Forschungsergebnissen der letzten Jahre es als erwiesen gelten darf, daß Nucleïnsäuren im allgemeinen von Purinbasen nur Guanin und Adenin, nicht aber Xanthin und Hypoxanthin (vgl. die kritischen Ausführungen von Burian[1]) enthalten, ist man berechtigt, die Purinfällung B als Adeninsilber in Rechnung zu ziehen.

Das Gewicht des Guanins, der Gesamtmenge des Ausgangsmaterials entsprechend, betrug 0,0741 g, dasjenige des Adeninsilbers 0,0938 g.

Bezüglich der Zusammensetzung des Adeninsilberniederschlages hat Kossel[2]) festgestellt, daß je nach der Menge des zu einer Adeninlösung hinzugefügten Silbers die Verbindung $C_5H_5N_5 . Ag$ oder aber $C_5H_5N_5 . Ag_2O$ ausfällt.

Obige Adeninsilbermenge entspricht demgemäß einem Quantum von 0,034 bis 0,052 g Adenin, wobei aber zu bemerken ist, daß nach Kossel in stark ammoniakalischer Lösung beträchtliche Adeninmengen der Fällung entgehen können, derart, daß obige Zahl als Minimalwert anzusehen ist. Es ergibt sich aber auf jeden Fall noch ein erhebliches Stickstoffdefizit, das vermutlich auf Pyrimidinbasen zu beziehen ist.

Die Angaben Bangs, daß die „Guanylsäure" von basischen Substanzen nur Guanin enthält, kann somit als widerlegt gelten[3]).

Wir möchten es nicht unterlassen, hier auf die interessante Feststellung Steudels[4]) hinzuweisen, derzufolge in der Nucleïnsäure aus Thymus und aus Heringsmilch die vier stickstoffhaltigen Komponenten Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin und nur diese in molekularen Verhältnissen vorkommen.

Nunmehr müssen die Ergebnisse weiterer Forschungen abgewartet werden, um zu erfahren, ob analoge Verhältnisse vielleicht

---

[1]) R. Burian, Chemie der Spermatozoen, Erg. d. Physiol. 5, 788 (1906).

[2]) Kossel, Über das Adenin, Zeitschr. f. physiol. Chemie 12, 245.

[3]) In dieser Hinsicht sind auch die Befunde von Inoko [Zeitschr. f. physiol. Chemie 18, 548 (1893)], Kutscher (Habil.-Schrift, Marburg 1899, Verl. von Trübner in Straßburg), Levene [Zeitschr. f. physiol. Chemie 37, 526 (1903) und 41, 393 (1904)], Kutscher und Lohmann, ibid. 39, 313 (1903) und M. Schenk, ibid. 43, 406 (1904) von Interesse, welche bei der Selbstverdauung des Pankreas neben Guanin reichlich andere Purin- und Pyrimidinderivate fanden.

[4]) H. Steudel, Die Zusammensetzung der Nucleïnsäuren aus Thymus und Heringsmilch, Zeitschr. f. physiol. Chemie 49, 406 (1906).

für alle Nucleïnsäuren tierischen Ursprungs gelten oder ob manche Nucleïnsäuren andere Relationen aufweisen.

4. Qualitatives Verhalten und quantitative Zusammensetzung.

Die Pankreasnucleïnsäure stimmt in ihrem qualitativen Verhalten gegenüber Reagenzien vollkommen mit den Thymonucleïnsäuren überein.

Nur ein Punkt bedarf noch einer kurzen Erörterung: nämlich ihr Verhalten gegenüber Essigsäure.

Bang gibt an, die Guanylsäure sei im Gegensatz zu anderen Nucleïnsäuren eine schwache Säure und bereits durch Essigsäure fällbar.

Wir haben auch in der Tat in einem Falle beobachtet, daß eine ziemlich konzentrierte Lösung von Pankreasnucleïnsäure in Alkali bei Neutralisation mit Essigsäure einen weder im Überschusse von Essigsäure, noch in der Wärme löslichen Niederschlag gab.

Bei einem anderen nach Neumanns Verfahren dargestellten Präparate haben wir jedoch dieses Verhalten vermißt. 0,1 g desselben wurde in 10 ccm Wasser unter Zusatz von etwas $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst: die amphoter reagierende Lösung ergab auch bei vorsichtigem Essigsäurezusatz keine Fällung.

Auch Levene fand die nach seinem Verfahren dargestellte Pankreasnucleïnsäure durch Essigsäure nicht fällbar.

Wir glauben daher auf diesen Punkt als Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Nucleïnsäuren umso weniger Wert legen zu sollen, als auch Bang und Raaschou eine „Guanylsäure" erhielten, die von Essigsäure nicht gefällt wurde, eine Abweichung, für welche die Autoren einen angeblichen Mehrgehalt an Glycerinpentose verantwortlich machten.

Was nun die analytische Zusammensetzung der Pankreasnucleïnsäure betrifft, hat, wie erwähnt, Bang den Umstand betont, daß dieselbe sich durch ihren hohen relativen Stickstoffgehalt ($P_4 : N_{20}$) von allen Nucleïnsäuren unterscheidet.

Levene fand in mehreren nach seinem Verfahren (Extraktion mit ammoniumacetathaltigem Ammoniak, Beseitigung der Eiweißkörper mit Pikrinsäure, Fällung mit salzsäurehaltigem Alkohol, Überführung in das Kupfersalz) dargestellten Präparaten 32,16 bis 32,68 Proz. C, 4,00 bis 4,57 Proz. H, 14,37 bis 15,36 Proz. N, 7,26 bis 7,97 Proz. P, 10,61 bis 15,99 Proz. Cu. Berechnet man aus den Analysen der einzelnen Präparate die Atomrelation, auf P_4 bezogen, so ergibt sich das Verhältnis $C_{41,9-43,7} H_{62,1-72,3} N_{16,3-18,0} P_4 Cu_{2,5-4,4}$.

Immerhin weicht auch hier die Relation zwischen Stickstoff und Phosphor von den den anderen Nucleïnsäuren eigentümlichen Verhältnissen $P_4 : N_{14}$ bzw. $P_4 : N_{15}$ noch einigermaßen zugunsten des Stickstoffs ab.

Wir haben nun bei der Analyse eines nach dem Vorgang von Löbisch[1]) (Kombination des Neumannschen Verfahrens mit der Kupferchloridmethode) dargestellten und 4 Wochen lang im Vakuum bei Zimmertemperatur getrockneten Präparates folgende Werte erhalten:

0,1384 g gaben 0,1486 g CO_2 = 29,27 Proz. C und 0,0528 g H_2O = 4,27 Proz. H.
0,1286 „ „ 0,1375 „ „ = 29,16 „ „ „ 0,0500 „ „ = 4,27 „ „
0,1878 „ „ 19,3 ccm N (8°, 711 mm) = 11,50 Proz. N.
0,1316 „ „ 13,5 „ „ (9°, 724 „) = 11,70 „ „
0,3910 „ „ 0,0694 g Cu_2S = 14,18 Proz. Cu und 0,0960 g $Mg_2P_2O_7$ = 6,83 Proz. P.
0,6444 g gaben 0,1152 g CuO = 14,32 Proz. Cu und 0,1605 g $Mg_2P_2O_7$ = 7,09 Proz. P.

	I Proz.	II Proz.	Mittel Proz.
C	29,27	29,16	29,22
H . . .	4,27	4,27	4,27
N. . . .	11,50	11,70	11,60
P. . . .	6,83	7,01	6,96
Cu . . .	14,18	14,32	14,25

woraus sich ein Atomverhältnis $C_{43,4}H_{75,5}N_{14,7}P_4Cu_{4,0}$ berechnen läßt.

Es weist sonach auch die Pankreasnucleïnsäure annähernd jenes Verhältnis zwischen Stickstoff und Phosphor auf, welches nach Steudel[2]) den Thymonucleïnsäuren zukommt.

Es liegt also gar kein Grund vor, der Pankreasnucleïnsäure anderen tierischen Nucleïnsäuren gegenüber eine Ausnahmestellung einzuräumen, und es dürfte sich empfehlen, die Bezeichnung „Guanylsäure", als auf einer irrigen Annahme basierend, ganz fallen zu lassen.

Zusammenfassung.

Nach Bang unterscheidet sich die Pankreasnucleïnsäure (Guanylsäure) sehr wesentlich von anderen Nucleïnsäuren, insofern sie ein Derivat der Glycerinphosphorsäure darstellt, zu etwa einem Drittel aus (bei der Hydrolyse in Form reduzierenden Zuckers abspaltbarem) Kohlehydrat besteht, von basischen Substanzen nur Guanin enthält und durch ihren hohen relativen Stickstoffgehalt ausgezeichnet ist.

---

[1]) Löbisch, l. c.
[2]) l. c.

Demgegenüber geht aus den eben mitgeteilten Beobachtungen hervor, daß das Molekül der Pankreasnucleïnsäure

a) kein Glycerin enthält;

b) keinen hydrolytisch abspaltbaren reduzierenden Zucker und nicht größere Furfurolmengen liefert als andere Nucleïnsäuren;

c) außer Guanin auch noch andere Purinbasen einschließt;

d) in ihrer Stickstoffphosphorrelation, sowie in ihrem sonstigen Verhalten mit anderen Nucleïnsäuren tierischen Ursprunges (Thymonucleïnsäure) übereinstimmt.

Es liegt also kein Grund vor, den Gegensatz zwischen Thymonucleïnsäure und „Guanylsäure“ auch fernerhin aufrecht zu erhalten.

Wien, März 1907.

IX.

Über Nitrochitine.

Von Prof. Dr. **Otto v. Fürth,**
Assistenten am physiologischen Institut der Universität in Wien
und **Emil Scholl.**

1.

Seit der Entdeckung des Chitins durch Odier[1]) im Jahre 1823 wurden eine Reihe von Arbeiten veröffentlicht, welche den Abbau dieses schwer angreifbaren Körpers zum Gegenstand haben. Ordnet man die dabei zur Anwendung gelangten Eingriffe nach chemischen Gesichtspunkten, so findet man, daß eine tiefgreifende Spaltung des Chitins einerseits durch Säuren, andererseits durch Alkalien erzielt worden ist.

Schon Payen[2]) stellte fest, daß Chitin von konzentrierten Mineralsäuren bereits in der Kälte gelöst wird, ohne über die dabei auftretenden Zersetzungsprodukte Rechenschaft geben zu können. Versuche über die Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure in der Wärme stellten Städeler[3]) und Bütschli[4]) an. Erst Ledderhose[5]) gelang es im Jahre 1875 das durch Auflösen des Chitins in Salzsäure erhaltene Abbauprodukt zu isolieren und als eine amidierte Hexose, als Glykosamin, zu bestimmen.

[1]) A. Odier, Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes. Mém. de la Soc. d'Hist. natur. de Paris 1, 35—38 (1823).

[2]) Payen, Propriétés distinctives entre les membranes végétales et les enveloppes des insectes et des crustaces. Compt. rend. 17, 227—231 (1843).

[3]) G. Städeler, Untersuchungen über das Fibroin, Spongin und Chitin. Ann. d. Chem. u. Pharm. 3, 21—28 (1859).

[4]) O. Bütschli, Einiges über das Chitin. Reichert u. Du Bois-Reymonds Arch. f. Anat. u. Physiol. 1874, S. 362—370.

[5]) Ledderhose, Über salzsaures Glykosamin. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 9, 1200—1201 (1876). Über Chitin und seine Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 213—227 (1878—1879).

Später erhielten Sigmund Fränkel und Agnes Kelly[1]) durch die Einwirkung von 70 proz. Schwefelsäure auf Chitin in der Kälte ein Monoacetyl-Chitosamin.

Natrium- oder Kaliumhydroxyd wirken in wässeriger, selbst konzentrierter Lösung, auch beim andauernden Erhitzen, nicht auf das Chitin ein. Das Chitin wird erst, wie zuerst Rouget[2]) fand und später C. Fischer unter Hoppe-Seylers[3]) Leitung, sowie Araki[4]) bestätigten, durch Erhitzen mit Ätzkali auf 180° in einen in Säuren löslichen Körper, das Chitosan, verwandelt.

Alle anderen angewandten chemischen Eingriffe ergaben kaum nennenswerte Resultate:

Loos[5]) ließ unterchlorigsaure Alkalien auf das Chitin einwirken; Krukenberg[6]) eine chlorgesättigte Kalium- oder Natriumkarbonatlösung; Zander[7]) kochte Krebsschalen mit konzentrierter Chlorzinklösung, ohne zu gut definierten Produkten zu gelangen.

Mit Rücksicht auf die eigentlich sehr geringe Mannigfaltigkeit der bisher angewandten chemischen Eingriffe, die entweder zu einer Hydrolyse des Chitins, oder aber zu einem sehr hoch molekularen Produkt, dem Chitosan, führen, lag es nahe, die Einwirkung von Oxydationsmitteln sowohl auf das Chitin selbst, wie auch auf sein Spaltungsprodukt, das Chitosan, zu studieren.

Läßt man auf Chitosan (nach dem von dem einen von uns gemeinsam mit Russo[8]) beschriebenen Verfahren dargestellt) verdünnte Salpetersäure (1 Teil Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,2 und 10 Teile Wasser) in der Siedhitze einwirken, so entsteht durch

---

[1]) S. Fränkel und A. Kelly, Beiträge zur Konstitution des Chitins. Sitzungsber. d. k. k. Akad. d. Wiss. in Wien. Mathem.-naturw. Klasse 110, Abt. II[1], Dez. 1901.

[2]) Ch. Rouget, Des substances amylacées dans les tissus des animaux, specialement des Articulés (Chitine). Compt. rend. 48, 792—795 (1859).

[3]) F. Hoppe-Seyler, Über Chitin und Cellulose. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 27, 3329—3331 (1894).

[4]) T. Araki, Über das Chitosan. Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 498—510 (1895).

[5]) Loos, Neue Lösungsmittel des Chitins. Zool. Anzeiger 8, 330—334 (1885).

[6]) Krukenberg, Die angebliche Löslichkeit des Chitins. Zeitschr. f. Biol. 22 (N. F. 4), 480—488 (1886).

[7]) Zander, Vergleichende und kritische Untersuchungen zum Verständnis der Jodreaktion des Chitins. Pflügers Arch. f. Physiol. 66, 545—573 (1897).

[8]) Otto v. Fürth und Michele Russo, Über kristallinische Chitosanverbindungen aus Sepienschulpen. Diese Beiträge 8, 163—190 (1906).

Hydrolyse Glykosamin. Wendet man direkt Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,2 in der Wärme an, so tritt nach einiger Zeit spontane Zersetzung unter reichlicher Gasentwickelung ein, die auch nach Entfernung der Flamme noch fortdauert. Aus der erkalteten Lösung kristallisiert Oxalsäure in Nadeln aus. Unterbricht man das Erhitzen im Momente des Beginns der Zersetzung und kühlt die Lösung rasch ab, so kann man nur die quantitative Überführung des Chitosans in Glykosamin, nicht aber die Bildung irgend eines Oxydationsproduktes nachweisen. Wendet man statt Salpetersäure Kaliumpermanganat in schwefelsaurer Lösung in der Kälte oder in der Wärme an, so gelangt man zu ähnlichen Resultaten.

Aus obigen Versuchen folgt, daß die Anwendung von Oxydationsmitteln in wässeriger oder saurer Lösung wegen der dabei stattfindenden Hydrolyse zu keinem Resultate führt. Um nun der Hydrolyse des Chitosans vorzubeugen, wurde die Oxydation mit Kaliumpermanganat in der Wärme nach vorhergegangener Suspension des Chitosans in 10 proz. Natronlauge vorgenommen. Es trat lebhafte Ammoniakentwickelung ein. Der Mangansuperoxydniederschlag enthielt reichliche Mengen unveränderten Chitosans. Das Filtrat davon zur Sirupdicke eingedampft, reduzierte sehr stark Fehlingsche Lösung und enthielt wieder Oxalsäure. Infolgedessen wurde auch dieser Weg verlassen.

Um nun dennoch zu einem Oxydationsprodukte des Chitosans oder des Chitins zu gelangen, erwies es sich als notwendig, die Gegenwart von Wasser während der Oxydation möglichst zu vermeiden. Dies wurde durch die Anwendung von Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,525 erreicht. Läßt man solche Salpetersäure auf scharf getrocknetes Chitin, freies Chitosan, oder auf salpetersaures Chitosan in der Kälte oder in der Wärme einwirken, so tritt glatt Lösung ein. Gießt man die kalte Lösung in dünnem Strahle in möglichst viel Wasser, so erhält man weiße in Wasser unlösliche Produkte in sehr befriedigender Ausbeute.

In der vorliegenden Mitteilung soll von den aus Chitin erhaltenen Derivaten, in einer weiteren von den aus Chitosan gewonnenen Produkten die Rede sein. Wie wir vorausschickend bemerken möchten, handelt es sich um Salpetersäureester, die sich aus Oxydationsprodukten des Chitins bilden und in ihrem Verhalten bemerkenswerte Analogien mit den Nitrocellulosen aufweisen.

2.

Ausgangsmaterial. Wir gingen von den Tegumenten von Nephrops norvegicus aus. Herr Professor Dr. Karl Cori, Direktor der k. k. zoologischen Station in Triest, hatte die Freundlichkeit, uns mit ausreichenden Mengen dieses Materials zu versehen. Die Reindarstellung des Chitins erfolgte nach dem Verfahren von Krawkow[1]). Die Krebsschalen und Scheren wurden zuerst durch mehrtägiges Stehen in einer Mischung von 1 Teil roher Salzsäure und 1 Teil Wasser entkalkt, hierauf mit Wasser gewaschen und wiederholt mit 20 proz. Natronlauge ausgekocht, um das Chitin von Eiweißkörpern zu befreien. Das neuerlich gewaschene Produkt wurde mit einer konzentrierten Lösung von Kaliumpermanganat behandelt und mit roher Salzsäure (1:10) erwärmt, sodann bis zum Verschwinden der sauren Reaktion gewaschen und an der Luft getrocknet. Das so erhaltene Präparat erschien nahezu farblos, nur mit einem schwachen Stich ins Gelbliche.

Einwirkung von Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,525 auf das Chitin in der Kälte. 100 g lufttrockenes Chitin wurde in 800 ccm Salpetersäure allmählich eingetragen. Nach und nach (im Verlaufe einer Stunde) trat vollkommene Lösung des Chitins ein. Man erhielt einen goldgelben, klaren, von zahlreichen Luftblasen durchsetzten Sirup. Während der Lösung fand keine Temperaturerhöhung statt. Der Sirup wurde in eine möglichst große Wassermenge (etwa 3 Liter) in sehr dünnem Strahle unter Umrühren eingegossen. Das Reaktionsprodukt fiel als weißer in Wasser vollkommen unlöslicher Körper aus. Die Ausbeute war nahezu quantitativ. Das auf diesem Wege resultierende Produkt wurde auf dem Saugfilter bis zum Verschwinden der sauren Reaktion gewaschen und an der Luft getrocknet.

Dasselbe stellt ein weißes, lockeres, sehr leicht verpuffendes Pulver dar. Es ist in absolutem Alkohol, Äther-Alkohol, Aceton und Eisessig teilweise löslich und kann aus der Aceton- und Eisessiglösung durch Petroläther gefällt werden. Der Körper zeigt mithin der Nitrocellulose analoge Eigenschaften. Beim Kochen mit verdünnten Alkalien tritt teilweise, beim Kochen mit konzentrierten vollkommene Zersetzung unter Braunfärbung und lebhafter Ammoniakentwickelung ein. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich das Produkt mit Leichtigkeit. Die Lösung bleibt farblos. In

[1]) N. P. Krawkow, Über verschiedene Chitine. Zeitschr. f. Biol. 29 (N. F. 11), 177—198 (1892).

Wasser eingegossen läßt sie nichts ausfallen (infolge von starker Hydrolyse, wie ein Versuch mit Fehlingscher Lösung zeigt). Kalte konzentrierte Salzsäure löst die Substanz leicht unter starker Entwickelung von Chlor und Nitrosylchlorid. Beim Eingießen in Wasser fällt ein Produkt aus, das immer noch Salpetersäure enthält.

Läßt man ein Gemisch von Salpetersäure (spez. Gew. 1,525) und konzentrierter Schwefelsäure auf Chitin einwirken, so erhält man eine Lösung, die nach dem Eingießen in Wasser ein Reaktionsprodukt von ähnlichen Eigenschaften liefert.

Einwirkung von Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,525 auf das Chitin in der Wärme. 100 g Chitin wurden in 800 cm^3 Salpetersäure eingetragen und hierauf zum Kochen erhitzt. Es trat augenblicklich Lösung des Chitins ein. Man kochte bis zum Verschwinden des größten Teiles der roten Dämpfe und kühlte hierauf das Reaktionsgemisch auf Zimmertemperatur ab. Die Lösung wurde, da sie eine geringe Menge ungelöster, flockiger Substanz enthielt, noch durch Glaswolle filtriert und nun wie vorhin in 3 Liter kalten Wassers eingegossen, wieder bis zum Verschwinden der sauren Reaktion gewaschen und an der Luft getrocknet.

Trennung der Salpetersäureester des Chitins durch Eisessig. Schon ein Vorversuch mit dem oben erhaltenen Körper zeigte, daß er in reichlichen Mengen in Eisessig löslich ist. Infolgedessen wurde das ganze durch die Einwirkung von Salpetersäure auf Chitin erhaltene Produkt mit der zehnfachen Menge Eisessig auf dem Ölbade unter Rückflußkühlung zwei Stunden lang zum Kochen erhitzt. Hierbei mußte durch wiederholtes Schütteln des Kochkolbens das Anbacken der Substanz verhindert werden, um die Bildung von Zersetzungsprodukten hintanzuhalten. Das Auskochen wurde mit frischen Mengen Eisessig so lange wiederholt, bis der Eisessig auf Zusatz von Wasser keine Fällung mehr gab. Nach dreimaligem Auskochen waren sämtliche in Eisessig löslichen Substanzen aus dem Rückstande entfernt. Die vereinigten Eisessigfiltrate wurden mit Wasser gefällt, hierauf der gefällte Körper abgesaugt und bis zum Verschwinden der Essigsäure gewaschen. Die Trocknung erfolgt zuerst an der Luft und dann im Thermostaten bei 40° bis zum konstanten Gewicht. Ein Trocknen bei höherer Temperatur erwies sich mit Rücksicht auf die leichte Zersetzlichkeit des Körpers, der sich auch hierin analog der Nitrocellulose verhielt, als untunlich. Die Ausbeute betrug 10 Proz. der angewandten Salpetersäureester. Die Substanz war vollkommen aschefrei.

Der in Eisessig unlösliche Rückstand erwies sich ebenfalls aschefrei.

Man erhält mithin durch die Einwirkung von Salpetersäure vom spezifischen Gewichte 1,525 auf Chitin zwei Reaktionsprodukte, von denen das eine in Eisessig löslich, das andere unlöslich ist.

3.

A. Eigenschaften des in Eisessig löslichen Reaktionsproduktes. Es stellt ein schwach gelb gefärbtes, sehr lockeres, amorphes Pulver dar, das beim Erhitzen unter Entwickelung von Stickoxyd verpufft. Es ist unlöslich in Äther, Petroläther, Benzol, Toluol und Chloroform; leicht löslich in Methylalkohol, absolutem Alkohol, in 95 proz. Alkohol, in heißem Amylalkohol. Es löst sich ferner leicht in Aceton, Essigsäureäthylester, Epichlorhydrin und in Eisessig.

B. Eigenschaften des in Eisessig unlöslichen Reaktionsproduktes. Es ist in sämtlichen Lösungsmitteln unlöslich. Wird es mit absolutem Alkohol, der mit trockenem Salzsäuregas gesättigt wurde, behandelt, so tritt beim Kochen Lösung ein. Aus dieser Lösung fällt bei Zusatz von Wasser ein weißer Körper aus. Salpetersäurereste sind darin vorhanden. Es handelt sich wahrscheinlich um einen Salpetersäureäthylester.

C. Gemeinsame charakteristische Reaktion der Produkte A und B. Löst man eine kleine Menge der einen oder anderen Substanz in konzentrierter Schwefelsäure, wobei man vorsichtig bis zur erfolgten Lösung erwärmen kann, und setzt nun einige Tropfen einer konzentrierten Eisenvitriollösung zu, so erhält man eine prachtvolle, blauviolette Färbung. Auf weiteren Zusatz von Eisenvitriol tritt Braunfärbung unter Entwickelung von Stickoxyd ein. (Die bekannte Reaktion auf Salpetersäure.)

Art der Einwirkung der Salpetersäure auf das Chitin. Daß eine Oxydation des Chitins durch die Einwirkung von Salpetersäure von spezifischem Gewicht 1,525 erfolgt, wird weiter unten auf Grund der Analysenergebnisse auseinandergesetzt werden. Es findet aber gleichzeitig eine Esterifizierung statt. Die erhaltenen Verbindungen zeigen gewisse Analogien mit Cellulose, die durch die Einwirkung von Salpetersäure esterifiziert und in die sogenannte Nitrocellulose verwandelt ist.

Löst man die Salpetersäureester des Chitins in konzentrierter Schwefelsäure und schüttelt mit Quecksilber, so wird Stickoxyd entbunden, da die Säuren des Stickstoffs durch die Einwirkung von metallischem Quecksilber zu Stickoxyd reduziert werden. Dieses

Verhalten setzt die Anwesenheit von freier Salpetersäure voraus, die durch die Einwirkung der Schwefelsäure frei wurde. Nitrocellulose verhält sich vollkommen gleich und es wird ja tatsächlich in der Sprengstofftechnik nach dieser Methode im Lungeschen Nitrometer der Gehalt der Nitrocellulose an Salpetersäureresten bestimmt.

Läßt man verdünnte Schwefelsäure auf das Salpetersäureprodukt in der Wärme einwirken, so findet Verseifung des Esters statt und freie Salpetersäure kann in reichlicher Menge nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für die Einwirkung von verdünnter Salzsäure und von verdünnten Alkalien.

Eine weitere Analogie mit der Nitrocellulose, d. h. mit den Salpetersäureestern der Cellulose, und deshalb auch ein Beweis für die Esternatur des erhaltenen Körpers, liegt in seiner überaus leichten Zersetzlichkeit bei höherer Temperatur. Angezündet, verpufft er momentan unter intensiver Lichtentwickelung. Wird eine kleine Menge in der Eprouvette im Ölbade langsam erwärmt, so tritt noch unter 200° plötzliche Zersetzung unter Entwickelung von roten Dämpfen ein.

Es kann demnach als erwiesen gelten, daß die Salpetersäure esterifizierend auf das Chitin einwirkt.

4.

Methodik der Analyse. Durch Verbrennung mit Kupferoxyd im Glasrohre konnte infolge der leichten Zersetzlichkeit der Substanzen nur der Wasserstoff bestimmt werden. Es stellte sich nämlich heraus, daß selbst beim Mischen der Substanz mit gepulvertem Kupferoxyd ein langsamer Verlauf der Verbrennung nicht zu erzielen war, und daß die Zersetzung spontan in wenigen Sekunden verlief, wodurch die Bestimmung des Kohlenstoffs unmöglich wurde. Brauchbare Resultate ergab die Methode der Bestimmung des Kohlenstoffs auf nassem Wege nach Messinger[1]), die deshalb auch zur Anwendung kam.

Die leichte Zersetzlichkeit der Substanzen machte es auch unmöglich, die Stickstoffbestimmung nach Dumas vorzunehmen. Stickstoff ist in zweifacher Form vorhanden, einerseits in Form von Salpetersäureresten, andererseits in molekularer Bindung. Wie schon weiter oben angeführt wurde, lassen sich die Salpetersäurereste durch die Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure sehr leicht abspalten. Es lag also die Möglichkeit vor, nach Abspaltung und Entfernung der Salpetersäurereste die Stickstoffbestimmung einfach nach Kjeldahl vorzunehmen. Es geschah dies auf folgende Art:

[1]) Vgl. Lassar-Cohn, Arbeitsmethoden, 3. Aufl., S. 1212 (1903).

Die Substanz wurde, wie üblich, mit Phosphorschwefelsäure im Rundkolben übergossen. Hierauf wurde eine kleine Menge gepulverten Eisenvitriols zugesetzt und schwach erwärmt. Durch den Eisenvitriol wurde die frei gewordene Salpetersäure zu Stickoxyd reduziert. Die Reaktion tritt nach kurzer Zeit ein und verläuft sehr lebhaft unter starker Entwickelung von roten Dämpfen. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Bestimmung auf bekannte Art zu Ende geführt.

Bestimmung der vom Chitin aufgenommenen Salpetersäure. Mit Rücksicht auf die leichte Verseifbarkeit der gebildeten Ester mußte eine Methode, die es ermöglicht, die frei gewordene Salpetersäure zu bestimmen, den meisten Erfolg versprechen. Am zweckmäßigsten erschien die Anwendung des Verfahrens von Schulze-Tiemann[1]) zur Bestimmung der Salpetersäure im Wasser. Das Einbringen der Substanz in das Zersetzungskölbchen und die Vorbereitung zur Analyse geschahen auf folgende Weise:

In das Zersetzungskölbchen wurde eine genügende Menge von destilliertem Wasser gebracht, zum Kochen erhitzt und nach einiger Zeit die in einem Röhrchen abgewogene Substanz in das Kölbchen gleiten gelassen. Sobald alle Luft verdrängt war, wurde das Kölbchen verschlossen und die Analyse nach Vorschrift ausgeführt.

Analysenergebnisse.

1. In Eisessig lösliche Substanz.

0,2717 g Substanz gaben 0,3412 g CO_2, entsprechend 33,49 Proz. C.
0,3295 g Substanz gaben 0,4090 g CO_2, entsprechend 33,85 Proz. C.
0,1968 g Substanz gaben 0,069 g H_2O, entsprechend 3,91 Proz. H.
0,2978 g Substanz gaben 0,1078 g H_2O, entsprechend 4,02 Proz. H.
0,3203 g Substanz verbrauchten 12,3 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4, entsprechend 5,37 Proz. N.
0,3587 g Substanz verbrauchten 15,0 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4, entsprechend 5,85 Proz. N.
0,3194 g Substanz gaben 40,3 ccm NO (20,5°, 759,8 mm), entsprechend 11,69 Proz. NO_2.
0,2694 g Substanz gaben 34,2 ccm NO (20°, 751,6 mm), entsprechend 11,77 Proz. NO_2.

			Mittel
C	33,49 Proz.	33,85 Proz.	33,67 Proz.
H	3,91 „	4,02 „	3,97 „
N	5,37 „	5,85 „	5,61 „
NO_2	11,69 „	11,77 „	11,73 „
O	—	—	45,02 „
			100,00 Proz.

Atomverhältnis $C_{7,02}H_{9,83}N_1(NO_2)_{0,64}O_{7,04}$.

[1]) Siehe Fresenius, Quant. Analyse 2, 155.

2. In Eisessig unlösliche Substanz.

0,2745 g Substanz gaben 0,3275 g CO_2, entsprechend 32,54 Proz. C.
0,2988 g Substanz gaben 0,3619 g CO_2, entsprechend 33,03 Proz. C.
0,2100 g Substanz gaben 0,0964 g H_2O, entsprechend 5,09 Proz. H.
0,2111 g Substanz gaben 0,0914 g H_2O, entsprechend 4,81 Proz. H.
0,6220 g Substanz verbrauchten 22 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4, entsprechend 4,96 Proz. N.
0,7263 g Substanz verbrauchten 24,2 ccm $^1/_{10}$ n-H_2SO_4, entsprechend 4,67 Proz. N.
0,3689 g Substanz gaben 52,7 ccm NO (20°, 740,7 mm), entsprechend 13,02 Proz. NO_2.
0,3279 g Substanz gaben 46,5 ccm NO (20°, 747,4 mm), entsprechend 13,04 Proz. NO_2.

			Mittel
C	32,54 Proz.	33,03 Proz.	32,78 Proz.
H	5,09 „	4,81 „	4,95 „
N	4,96 „	4,67 „	4,81 „
NO_2	13,02 „	13,04 „	13,03 „
O	—	—	44,43 „
			100,00 Proz.

Atomverhältnis $C_{7,97}H_{14,34}N_1(NO_2)_{0,82}O_{8,10}$.

5.

Über die elementare Zusammensetzung des Chitins geben folgende Analysen Aufschluß:

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	O Proz.
Ledderhose[1]), Mittel	45,78	6,55	7,01	40,66
Städeler[2])	46,32	6,40	6,14	41,14
Sundwick[3]), Mittel	46,78	6,41	6,35	40,46
Araki[4]), Mittel	46,23	6,43	6,20	41,14
C. Schmidt[5]), Mittel	46,74	6,63	6,41	40,22
Mittel aller Analysen .	46,37	6,48	6,42	40,72

Atomverhältnis $C_{8,36}H_{13,70}N_1O_{5,46}$.

[1]) Ledderhose, Über Chitin und seine Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 2, 213—227 (1878—1879).
[2]) G. Städeler, Untersuchungen über das Fibroin, Spongin und Chitin. Ann. d. Chem. u. Pharm. 3, 582—583 (1859).
[3]) E. Sundwick, Zur Konstitution des Chitins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 385—394 (1881).
[4]) T. Araki, Über das Chitosan. Ebenda 20, 498—510 (1895).
[5]) C. Schmidt, Zur vergl. Physiologie der Wirbellosen. Braunschweig, Friedr. Vieweg u. Sohn, 1845. Ann. d. Chem. u. Pharm. 54, 298—311 (1845).

Stellt man nun die Analysenresultate einander gegenüber, so erhält man:

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	NO_2 Proz.	O Proz.
In Eisessig lösliche Salpetersäureester des Chitins	33,67	3,97	5,61	11,73	45,02
In Eisessig unlösliche Salpetersäureester des Chitins	32,78	4,95	4,81	13,03	44,43
Reines Chitin	46,37	6,48	6,42	—	40,72

Atomverhältnisse:

In Eisessig lösliche Salpetersäureester des Chitins . $C_{7,02}H_{9,88}N_1(NO_2)_{0,64}O_{7,04}$
In Eisessig unlösliche Salpetersäureester des Chitins . $C_{7,97}H_{14,24}N_1(NO_2)_{0,82}O_{8,10}$
Reines Chitin . . . . $C_{8,36}H_{13,70}N_1O_{5,46}$.

Aus den Analysen und Atomverhältnissen ist ohne weiteres eine Sauerstoffzunahme im Reaktionsprodukte wahrnehmbar. Es liegen also in Wirklichkeit Oxydationsprodukte des Chitins vor, die überdies Salpetersäurereste enthalten.

Anhang.

Einwirkung von salpetriger Säure auf Chitosan.

Zum Schluß sei noch einer Reaktion des Chitosans Erwähnung getan, die möglicherweise für den rationellen Abbau desselben von Nutzen sein könnte. Es handelt sich um die Einwirkung von salpetriger Säure auf das Chitosan. Läßt man die Lösung eines salpetrigsauren Salzes auf Chitosan in salzsaurer Lösung einwirken, so gelangt man zu einem Körper, der weder mit dem Chitosan noch dem Glykosamin identisch ist.

Etwa 10 g Chitosan wurden in einer sehr kleinen Wassermenge suspendiert und in einem geringen Überschusse verdünnter Salzsäure gelöst. Zur klaren Lösung wurde tropfenweise eine 5 proz. Lösung von Natriumnitrit so lange zugegeben, bis ein Tropfen des Reaktionsgemisches, mit Natronlauge versetzt, klar blieb. Während der Zugabe des Natriumnitrits trat ohne Erwärmung und ohne Geruch nach salpetriger Säure sehr lebhafte Gasentwickelung ein. Die Lösung wurde nun mit Ätznatron neutralisiert und dann mit Alkohol gefällt.

Das Reaktionsprodukt ist ein schwach gelblich gefärbtes, amorphes Pulver. Es ist in Wasser, verdünnten Säuren und Alkalien leicht löslich. Beim Kochen mit Natronlauge wird die Lösung braun. Sie reduziert Fehlingsche und ammoniakalische Silberlösung. Die Substanz ist stickstoffhaltig.

Die weitere Charakteristik und den Abbau der beschriebenen aus Chitin und Chitosan erhaltenen Derivate behalten wir uns vor.

Zusammenfassung.

1. Während der schrittweise Abbau von Chitin und Chitosan mit Oxydationsmitteln in wässeriger Lösung sich nicht als tunlich erwies, gelang es durch Einwirkung sehr starker rauchender Salpetersäure (spez. Gew. 1,525) zu oxydativen Abbauprodukten zu gelangen.

2. Die durch die genannte Säure in der Kälte, in der Wärme, sowie bei Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure bewirkte Oxydation geht mit Esterbildung (Anlagerung von Salpetersäuregruppen) einher.

3. Durch Einwirkung der rauchenden Salpetersäure auf Chitin wurden zwei Produkte erhalten, von denen das eine in allen gewöhnlichen Lösungsmitteln unlöslich ist, während das andere von zahlreichen Lösungsmitteln, wie Alkohol, Aceton, Essigäther, Eisessig (nicht aber von Äther, Petroläther, Benzol und Chloroform), leicht aufgenommen wird.

4. Die vom Chitin abgeleiteten Salpetersäureester zeigen in ihrem Verhalten gewisse Analogien mit den Nitrocellulosen. Sie verpuffen mit großer Heftigkeit unter Feuererscheinung und spalten den in den Nitrogruppen enthaltenen Anteil ihres Stickstoffs beim Schütteln der schwefelsauren Lösung mit Quecksilber, sowie bei Zusatz von Ferrosulfat zu denselben in Form von Stickoxyd, bei der hydrolytischen Einwirknng von Säuren und Alkalien in der Wärme in Form von Salpetersäure ab. Sie werden von kalter konzentrierter Salzsäure unter Entwickelung von Chlor und Nitrosylchlorid und Bildung wasserunlöslicher Produkte angegriffen, von absolut alkoholischer Salzsäure anscheinend unter Esterbildung gelöst.

5. Durch Einwirkung von salpetriger Säure auf das Chitosan gelangt man zu einer wasser-, säure- und alkalilöslichen, durch Alkohol fällbaren, Fehlingsche Lösung und ammoniakalische Silberlösung reduzierenden Substanz.

Wien, März 1907.

X.

Versuche über Stoffwechsel und Energieverbrauch an pankreaslosen Hunden.

Von **W. Falta, F. Grote** und **R. Staehelin.**

Aus der medizinischen Klinik in Basel (Direktor Prof. Dr. W. His).

In den vorliegenden Untersuchungen sollte der Energieverbrauch pankreasdiabetischer Hunde mit dem Jaquetschen Respirationsapparat bestimmt werden. Es stellte sich aber bald heraus, daß der Untersuchung desselben große Schwierigkeiten entgegenstehen, indem sich nach der Exstirpation des Pankreas eine glatte Verheilung der Bauchwunde, wie auch andere Autoren hervorheben, kaum erzielen läßt. Da wir die Arbeit aus äußeren Gründen abbrechen mußten, so sind wir leider zu einer vollständigen Lösung der uns gestellten Fragen nicht gelangt, glauben aber doch unsere Untersuchungen veröffentlichen zu sollen, da sie in verschiedener Hinsicht von Interesse sind, und da der Gesamtstoffwechsel des pankreaslosen Hundes überhaupt noch wenig untersucht ist.

Experimenteller Teil.

Bezüglich der Methodik verweisen wir auf unsere frühere Arbeit[1]).

A. Versuche an Hund Juno[1]).

Der Hund, 23 kg schwer, wurde am 29. Mai 1906 3 Uhr p. m. von Herrn Professor Enderlen, dem wir hierfür an dieser Stelle unsern besten Dank aussprechen, in Morphium-Äthernarkose operiert, nachdem er mehr als zwei Tage vorher ohne Nahrung belassen worden war.

---

[1]) Vgl. W. Falta, F. Grote und R. Staehelin, Versuche über Kraft- und Stoffwechsel des Hundes usw. (Diese Beiträge 9, 1907.) Diese Versuche sind an demselben Hund (Juno) angestellt worden. Die Exstirpation des Pankreas wurde unmittelbar an diese Versuche angeschlossen.

Die Operation dauerte drei Viertelstunden. Der Hund erholte sich rasch von der Operation. In dem um 5 Uhr p. m. durch Katheterisieren entleerten Harn (108 ccm) fand sich noch kein Zucker. Am 30. Mai morgens wurden durch Katheterisieren 290 ccm Harn entleert. In demselben 3,75 g Dextrose (durch Polarisation vor und nach der Vergärung bestimmt) und 4,732 g Stickstoff; p. St. = 0,338 g N; D : N daher = 0,79. Temp. = 38,8° C. Abends Körpergew. 22,8 kg. Temp. = 40,1° C. 31. Mai morgens Temp. = 38,8° C.

Harn von 7 Uhr abends (30. Mai) bis 7 Uhr morgens (31. Mai): 485 ccm vom spez. Gew. 1046; in demselben 22 g D und 6,72 g N; p. St. = 0,56 g N D : N = 3,28 (bei Zimmertemperatur von etwa 16° C); Aceton- und Acetessigsäure-Reaktionen negativ.

Da der Diabetes nun voll entwickelt war, wurde an diesem Tage mit den Versuchen begonnen.

Zur Methodik muß erwähnt werden, daß der Hund in diesen Versuchen, besonders später, als er schwächer wurde, häufig den Harn nicht mehr während der ganzen Versuchsperiode hielt, sondern teilweise in den Kasten ließ. Die Blase wurde natürlich jedesmal am Beginn und nach Beendigung jeden Versuches mit dem Katheter entleert, der Kasten sorgfältig ausgespült und sämtliche Portionen vereinigt. Wir können in den Tabellen dieser Arbeit daher die eigentlichen Harnmengen nicht angeben, auch dürften wegen Verdunstung kleiner Mengen des im Kasten sich ansammelnden Harnes die Bestimmungen des durch Lungen und Haut abgegebenen Wassers weniger genau sein.

Der Hund verendete am 11. Juni, nachdem er zum Skelett abgemagert war. Bei der Sektion fanden sich die Bauchdecken zu beiden Seiten der Schnittnarbe im Bereich einer etwa handtellergroßen Partie flächenhaft infiltriert, mit zentraler Einschmelzung an der Narbe. Bei der Eröffnung der Bauchhöhle zeigte sich das Mesenterium des Duodenums mit dem unteren Abschnitt des Colon ascendens verlötet, das Peritoneum sonst überall glatt und spiegelnd. Die mikroskopische Untersuchung des Duodenums und der mit demselben verlöteten Partien ergab vollständiges Fehlen irgendwelcher Reste von Pankreasgewebe.

Berechnung der Wärmeproduktion.

	C in der Respiration	Calorien	H_2O durch Lungen und Haut	Calorien aus Wasser-verdampfung
aus Eiweiß	12,61	128,1	—	—
aus Fett	76,00	934,8	—	—
aus Kohlenhydrat . .	—	—	—	—
Total	88,61	1062,9	708,3	—
pro Stunde	—	53,1	—	—
pro Stunde und kg .	—	2,44	1,63	0,97

Versuch I. (31. Mai 1906.)

Periode	Nahrung	Respiration: C [CO_2] in der Atemluft		O_2-Verbrauch		R. Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		Harn: N		C	H der Trockensubstanz	NH_3	D	D : N	C/N nach Abzug des Zuckers	Temperatur	Körpergewicht
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.	in toto	stdl.								
11—3h[1])	—	17,385 [63,736]	15,934	67,448	16,862	0,683	5241,5	119,5	39,8	3,865	0,484	5,986	1,455	—	11,833	3,062	0,323	38,3	22,2
3—7h		17,572 [64,420]	16,105	67,138	16,784	0,694	4811,3	142,0	35,5										
7—7h 38 [8h]		4,632 [16,982]	16,982	17,582	17,582	—	—	25,0	37,5										21,5
7h 38 [8h] —1h		24,364 [89,32]	17,86	90,790	18,18	0,711	6318,1	204,0	34,0	6,37	0,531	—	—	0,251	22,14	3,471	—	—	
1—7h 1. VI.		24,657 [90,392]	15,065	93,662	15,61	0,698	6823,5	204,0	34,0									39,7	21,5
Total 8 Stdn.		88,610		336,620	—	—	—	708,3	—	10,235	Mittel 0,517	—	—	—	33,973	Mittel 3,27	—	—	Mittel 21,75

[1]) Die Respiration erst von 12 Uhr an untersucht, auf 4 Stunden berechnet.

Versuch I.

Bemerkungen: Es war leider unterlassen worden, die Temperatur des Hundes vor der Pankreasexstirpation zu messen. Die Temperatur von 38,3° C zu Beginn des Versuches entspricht der bei Hunden gewöhnlich beobachteten Normaltemperatur. Hingegen ist die am Ende des Versuches beobachtete Temperatur von 39,7 zweifellos pathologisch. Die Untersuchung der Bauchwunde ergab an einer Nahtstelle einen etwa halbkirschgroßen Abszeß, aus dem sich bei Druck einige Tropfen Eiter entleerten.

Die Berechnung der Beteiligung von Eiweiß, Kohlehydraten und Fett am Stoffwechsel wurde in analoger Weise wie in den Versuchen am normalen Hund durchgeführt; nur mußte natürlich der Ausfall des Zuckers in Rechnung gezogen werden. Für die Nüchternversuche war dies relativ einfach.

a) Beteiligung von Eiweiß, Fett und Kohlehydraten an der Zersetzung.

Im Harn erschienen 10,235 g N. Diesen entsprechen nach Zuntz[1]) unter normalen Verhältnissen 26,205 g C (10,235 × 2,56) in der Exspirationsluft. Nun erscheinen hier aber im Harn 33,973 g D, die wir aus dem Eiweiß ableiten. Diese enthalten 13,589 g C. Es sind demnach um 13,589 g C weniger in der Exspirationsluft erschienen, also es stammen aus Eiweiß nur 26,205—13,589 = 12,613 g C. Im Ganzen sind durch Lungen und Haut ausgeschieden worden 88,610 g C. Es stammen daher aus Fett (+ Kohlehydraten?) 88,610—12,613 = 75,997 g C. Unter der Annahme, daß diese nur aus Fett stammten, hätten sie zu ihrer Oxydation 285,08 g O_2 gebraucht.

Eine Eiweißzersetzung, entsprechend dem Erscheinen von 10,235 g N im Harn, braucht nach Zuntz unter normalen Verhältnissen 10,235 × 8,45 = 86,486 g O_2. Davon ist aber in unserem Falle diejenige Menge O_2 abzuziehen, welche zur vollständigen Oxydation des aus dem Eiweiß stammenden Harnzuckers notwendig ist. 1 g Zucker-C braucht zur vollständigen Oxydation 2,67 g O_2; 13,589 g C (in 33,973 g Dextrose) brauchen daher 36,266 g O_2. Für die Oxydation des Eiweißes sind also in unserem Versuche nur 86,486 — 36,266 = 50,260 g O_2 erforderlich gewesen.

Im Ganzen wurden nun verbraucht	336,620 g O_2
Auf das Eiweiß entfallen	50,260 g O_2
Für N-freies Material bleiben	286,36 g O_2

[1]) N. Zuntz, Höhenklima und Bergwanderungen usw. Berlin 1906, p. 103.

Aus der Übereinstimmung zwischen dieser Zahl mit der oben berechneten geht hervor, daß die Annahme, es stamme der nach Abzug des Eiweiß-C bleibende C-Rest nur aus Fettverbrennung, richtig war.

b) Berechnung der Wärmeproduktion.

Dem N des Harnes zufolge würden sich nach Rubner[1]) 10,235 × 25 (Nüchternwert) = 255,9 Cal aus dem Eiweiß herleiten, wenn dieses vollständig verbrannt wäre.

Durch den Ausfall des Eiweißzuckers gehen aber 36,266 × 3,762 (Brennwert der Dextrose) = 127,8 Cal verloren. Es stammen also aus dem Eiweiß nur 255,9—127,8 = 128,1 Cal. Die übrige Menge des C in der Exspirationsluft (76,0 g) stammt, wie wir gesehen haben, aus Fettverbrennung, lieferte also nach Rubner 76,0 × 12,3 = 934,8 Cal; Totalkalorienproduktion in Versuch I daher 128,1 + 934,8 = **1062,9.**

Versuch II.

Bemerkungen: Um 8 Uhr 20 morgens erhielt der Hund 150 g Dextrose (Merck) in 500 g Wasser gelöst mit der Schlundsonde eingegossen. Der Hund behielt die Dextrose gut bei sich und nützte sie, wie aus den Kotanalysen hervorgeht, gut aus. Der Kot, der für diese Tage gesondert abgegrenzt worden war, wog trocken 22,25 g und enthielt 1,64 g N. Dem entsprechen 1,64 × 6,25 = 10,25 g Eiweiß. Es bleiben also überhaupt nur 12 g für Ätherextrakt, Salze und Kohlehydrate übrig.

In der Periode von 2 bis 7 Uhr nachmittags trat bei dem Hunde eine eigentümliche tiefe Atmung auf, welche an die beim Coma diabeticum erinnerte. Gleichzeitig trat jetzt deutlicher Acetongeruch der Atemluft auf. Im Harn, der früher nur Spuren Aceton enthalten hatte, wurden an diesem Tage 1,15 g Aceton von morgens 7 Uhr bis abends 7 Uhr ausgeschieden[2]). Im Harn der Periode von 7 Uhr morgens bis 2 Uhr nachmittags, also unmittelbar nach der Dextroseeinfuhr trat ein eigentümliches Phaenomen auf, das wir hier einfach registrieren wollen. Der Harn, der starke Trommersche Probe gab, zeigte nur eine geringe Rechtsdrehung entsprechend 0,321 Proz. D (Doppelbestimmung). Bei der Titration nach

---

[1]) Rubner, Gesetze des Energieverbrauches, Leipzig und Wien 1902, S. 19.

[2]) Bei der Berechnung der Kalorienproduktion können diese und die mit der Atemluft in Verlust geratenen Mengen vernachlässigt werden.

Versuch II. (1. Juni 1906.)

Periode	Nahrung	Respiration								Harn								Temperatur	Körpergewicht
		C[CO_2] in der Atemluft		O_2-Verbrauch		R.Q.	Ventilation	H_2O durch Lungen u. Haut		N		C	H	NH_3	D	D:N	C/N nach Abzug des Zucker-C		
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.	in toto	stdl.								
7—8h 30[1]) [9h]	150 g Dextrose, 500 g Wasser	10,886 [39,910]	19,95	31,545	15,772	—	—	47,4	31,6	3,57	0,51	25,25	5,544	0,451	58,225	—	0,55	40,0	21,5
8h 30 [9]—2h		20,247 [74,227]	14,845	79,677	15,935	0,674	5865,8	161,2	29,3										
2—3h [3h 30]		6,337 [23,28]	15,55	23,959	15,978	—	—	25,5	25,5	2,61	0,522	—	—	0,190	56,55	—	—	39,4	
3h [3h 30] —7h		15,160 [56,87]	16,25	56,040	16,011	0,734	3941,1	86,7	21,7										
7—8h [8h 30]		6,164 [22,597]	15,305	23,301	15,534	—	—	25,5	25,55	2,163	0,393	—	—	0,119	11,38	—	—	39,9	
8h [8h 30] —12h 30		15,669 [57,443]	14,361	60,233	15,058	0,690	4842,1	117,8	29,4									39,7	20,2
Total 17½ Stdn.	150 g Dextrose, 500 g Wasser	74,463	—	274,755	—	—	—	464,1	—	8,34	Mittel 0,477	—	—	0,760	126,15 [38,56 aus Eiweiß]	[3,27]	—	—	Mittel 20,4

[1]) Respiration erst von 11h 45 an untersucht. Auf 5 Stunden berechnet.

Berechnung der Wärmeproduktion [Versuch II].

	C in der Respiration	Calorien	Wasser-verdampfung	Calorien aus Wasser-verdampfung
aus Eiweiß	11,452	106,0	—	—
aus Fett	58,704	712,0	—	—
aus Kohlehydrat . .	4,307	40,3	—	—
Total	74,463	858,4	464,1	278,5
pro Stunde	—	49,5	—	—
pro Stunde und kg .	—	2,40	1,30	0,78

Fehling wurden in dem mit Thymol konservierten Harn nach zwei Tagen 3,425 Proz. D gefunden. Als nochmals polarisiert wurde, entsprach die Rechtsdrehung nun 3,33 Proz. Zucker[1]). In diesem Harn fand sich auch der höchste Wert für NH_3 nämlich 0,451 g = 0,0644 g p. St. Im Harn von 2 Uhr nachmittags bis 7 Uhr abends fanden sich noch 0,190 g NH_3 = 0,038 g p. St. In den dem Dextroseversuch vorangehenden Perioden hatten sich nur 0,251 g NH_3 = 0,021 g p. St., resp. 0,119 g NH_3 = 0,02 g p. St. gefunden.

Die Berechnungen gestalten sich in diesem Versuche komplizierter, weil die Zuckermenge im Harn sich jetzt aus zwei Faktoren zusammensetzt, dem Eiweißzucker und dem Nahrungszucker. Da sich der Versuch zeitlich unmittelbar dem Versuch I anschließt, so wollen wir der Berechnung den im Versuch I gefundenen Quotienten D : N (3,27) zugrunde legen. Die Benutzung der Minkowskischen Zahl (2,8) würde an dem Resultat überdies nichts Wesentliches ändern.

Im Harn wurden nun 8,34 g N ausgeschieden. Es kämen also 8,34 × 3,27 = 27,27 g (= 9,398 g C) des Harnzuckers auf Eiweiß. 8,34 g N im Harn entsprechen unter normalen Verhältnissen 8,34 × 2,56 = 21,35 g C in der Exspirationsluft. Davon sind 9,898 g C, welche den Körper durch den Harn als Zucker verließen, in Abzug zu bringen. Es bleiben daher 11,452 g C. Durch Lungen und Haut sind ausgeschieden worden: 74,463 g C. Es kommen daher auf Fett- und Kohlehydratverbrennung 74,463 — 11,452 = 63,011 g C. Diese brauchen, wenn sie nur aus Fett stammen, zur Oxydation 236,354 g O_2. Im Ganzen wurden aufgenommen: 274,755 g O_2.

[1]) Sandmeyer (über die Folgen der Pankreasexstirpation usw. Zeitschr. f. Biolog. 29, 1892) gibt an, in den ersten Tagen nach der Exstirpation bisweilen starke Linksdrehungen, in einem Falle bis — 4,00 Proz. beobachtet zu haben.

Unter normalen Verhältnissen würde das umgesetzte Eiweiß 8,34 $\times$ 8,45 = 69,673 g O_2 zur Oxydation benötigt haben. Da aber 27,27 g Zucker unverbrannt abgehen, so werden um 26,433 g O_2 weniger verbraucht, also nur 69,672 — 26,433 = 43,239 g O_2. Es fallen also auf Fett und Kohlehydrate 274,755 — 43,239 = 231,516 g O_2. Nach der Formel $x\ 3{,}751 + (y - x)\ 2{,}651 = O_2$[1]) kommen dann 58,704 g C auf Fett und 4,307 g C auf Kohlehydrat. Hätten wir die Minkowskische Zahl der Berechnung zugrunde gelegt, so hätten wir die Zahlen **234,265** für das berechnete und **235,562** für das gefundene O_2-Bedürfnis erhalten.

Auf jeden Fall sind also nur Spuren von Kohlehydraten verbrannt, was sich auch im Verhalten des RQ ausdrückt. Da aber nun nur 126,15 g D im Harn erschienen, wovon noch 27,27 g (resp. nach dem Quotienten 2,8 = 23,35 g) D aus Eiweiß stammen, da ferner mit dem Kot nur wenige Gramm verloren gegangen sein können, so muß der Rest noch im Körper verblieben, und der Zuckergehalt des Blutes und der Gewebe am Ende des Versuches dadurch noch beträchtlich vermehrt gewesen sein. Wir sehen daraus, daß wir aus einem Zurückbleiben der Ausgaben gegenüber den Einnahmen nicht ohne weiteres auf eine im Körper stattgehabte Verbrennung schließen dürfen.

Berechnung der Kalorienproduktion:

Aus dem N des Harnes würden sich 8,34 $\times$ 25 = 208,58 Cal aus Eiweiß berechnen. Durch den Ausfall des Eiweißzuckers gehen aber 27,27 $\times$ 3,762 = 102,59 Cal verloren. Es stammen also aus dem Eiweiß 208,58 — 102,59 = 105,99 Cal. 58,704 g C der Exspirationsluft stammen aus Fett. Diese entsprechen 58,704 $\times$ 12,3 = 712,06 Cal, und 4,307 g Kohlehydrat-C entsprechen 4,307 $\times$ 9,5 = 40,32 Cal; Gesamtkalorienproduktion daher = 858,4 Cal.

Versuch III.

In der vorangehenden Nacht um 3/4 1 Uhr (nach Beendigung des Versuches II) hatte der Hund 150 g Lävulose mit der Schlundsonde eingeführt bekommen. Da er bald nachher erbrach, wurde der Respirationsversuch unterbrochen. Der Hund war nachher sehr elend, erholte sich aber rasch wieder. Am Morgen (2. Juni) wurde noch ein Nüchternversuch angeschlossen. Der Quotient D:N be-

[1]) Vgl. Falta, Grote und Staehelin, a. a. O., S. 345.

Versuch III. (2. Juni 1906.)

Periode	Nahrung	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft, in toto	Respiration: $C[CO_2]$ in der Atemluft, stdl.	Respiration: O_2-Verbrauch, in toto	Respiration: O_2-Verbrauch, stdl.	Respiration: R. Q.	Respiration: Ventilation	Respiration: H_2O durch Lungen u. Haut, in toto	Respiration: H_2O durch Lungen u. Haut, stdl.	Harn: N, in toto	Harn: N, stdl.	Harn: C	Harn: H	Harn: NH_3	Harn: D	Harn: D:N	Harn: C/N nach Abzug des Zuckers-C	Temperatur	Körpergewicht
10^h45[1]) $[11^h45]$ -3^h45	—	18,334 [67,123]	13,445	68,593	13,719	0,719	6354,0	2,617	25,06	2,617	0,523	—	—	0,173	11,5 [8,56 aus Eiweiß]	4,39 [3,27]	—	39,4	21,0

Berechnung der Wärmeproduktion.

	C in der Respiration	Calorien	Wasser-verdampfung	Calorien aus Wasserverdampfung
aus Eiweiß	83,28	33,1	—	—
aus Fett	14,28	175,6	—	—
aus Kohlehydrat . .	0,78	7,4	—	—
Total	18,334	216,1	125,3	75,2
pro Stunde	—	43,2	—	—
pro Stunde und kg .	—	2,10	1,22	0,73

[1]) Respiration erst von 11^h45 an untersucht, auf 5 Stunden berechnet.

trug während desselben 4,39. Die hohe D-Ausscheidung ist jedenfalls noch auf die Dextrose, vielleicht zum Teil auch noch auf die Lävuloseeinfuhr zu beziehen, da voraussichtlich ein kleiner Teil der Lävulose doch resorbiert worden war; die Seliwanoffsche Reaktion war am Morgen noch schwach vorhanden gewesen. Für die Berechnung wurde der Quotient D:N = 3,27 (wie in Versuch I und II) eingesetzt. Die Berechnung ergibt dann 0,78 g C in der Exspirationsluft aus Kohlehydratverbrennung. Diese Menge fällt fast noch in die Fehlergrenzen der Methode. Sie wäre überdies ganz gut auf die Lävulose zu beziehen.

Versuch IV.

Am 3. und 4. Juni bekam der Hund je 500 g Pferdefleisch zu fressen. Die Temperatur hielt sich während dieser Zeit zwischen 39 und 39,2° C. Die Bauchwunde sah gut aus, war aber bei Druck etwas schmerzhaft. Am 5. Juni nachmittags wurde ein vierstündiger Nüchternversuch gemacht (genaue Zeit: 2 Uhr 15 bis 6 Uhr 9 nachmittags). Der Quotient D:N ist jetzt auf 1,97 abgesunken. Wenn dieses Absinken des Quotienten D:N ein Wiederauftreten der Fähigkeit, Eiweißzucker zu verbrennen, bedeuten soll, so müßte mit dem Absinken des Quotienten ein Ansteigen des R.Q. auftreten, vorausgesetzt, daß nicht die Ketonurie währenddessen wesentlich zugenommen hat. Die Ketonurie ist jetzt aber eher schwächer als früher. Denn die Aceton- und Acetessigsäure-Reaktionen waren nur schwach vorhanden, auch ergab sich nur eine sehr geringe Differenz zwischen dem Polarisations- und Titrationswert (0,975 gegenüber 1,00 Proz.). Der R. Q. ist nun in diesem Versuch auffallend tief (0,675). Es wäre daraus zu schließen, daß O_2-reiche Körper (Zucker oder Glykogen) im Organismus zurückgehalten wurden. Zu einem ähnlichen Resultat führt auch die Berechnung. Denn bei Benutzung des tatsächlich gefundenen Quotienten 1,97, d. h. bei der Annahme, daß ein Teil des Eiweißzuckers wirklich verbrannt ist, würde die nach Abzug des Eiweiß-C bleibende C-Menge, auf Fett bezogen, einen O_2-Verbrauch von 32,781 bedingen, während der nach Abzug des Eiweißanteiles am O_2-Konsum tatsächlich gefundene Sauerstoffverbrauch 33,678 betrüge. Das macht in 24 Stunden eine Differenz von fast 6 g O_2. Das würde bedeuten, daß außer einem Teil des Eiweißzuckers sonst noch Zucker verbrannt ist, was sehr unwahrscheinlich ist. Nehmen wir dagegen den Quotienten 2,8 zur Berechnung, so finden wir genau übereinstimmende Werte. Der berechnete O_2-Verbrauch

würde dann betragen 35,91 g, der gefundene 35,99 g. Das dürfte dafür sprechen, daß überhaupt kein Zucker verbrannt, sondern daß nur ein Teil des aus dem Eiweiß stammenden Zuckers zurückbehalten worden ist. Wir kommen auf diese Auffassung später noch zurück.

Besonders sei noch hervorgehoben, daß die Eiweißzersetzung in diesem Versuche nicht absinkt, sondern an der oberen Grenze sämtlicher bisher beobachteter Werte steht.

Versuch V.

Um 7 Uhr abends fraß der Hund 658 g Pferdefleisch = 21,06 g N. Die Ausnützung war schlecht, obwohl dem Fleisch ein voller Eßlöffel Pankreatin (Rhenania) beigemischt worden war. Der für die 25 Stunden des Versuches abgegrenzte Kot wog feucht 289, trocken 64,5 g, enthielt 39,318 g C, 5,513 g H und 10,06 g N. Es sind also immerhin doch 11 g N aus Fleisch in Umsatz gekommen.

Die in dem Versuch beobachteten Tatsachen seien hier nur kurz registriert. Es soll später noch darauf zurückgekommen werden.

1. Die N-Ausscheidung bleibt trotz der Fleischzufuhr vollständig gleichmäßig. Das ist auch verständlich, denn im Hungerzustande werden in den vorhergehenden Versuchen stündlich 0,5—0,6 g N ausgeschieden; im unmittelbar vorhergehenden Versuch IV sogar 0,64 g. Die Hungerzersetzung beträgt also in 24 Stunden 12 bis 15 g N, ist also größer als die tatsächlich resorbierte N-Menge.

2. Bei Berücksichtigung der ganzen 24stündigen Periode beträgt der Quotient D : N = 3,0. Durch Fleischzufuhr ist also der Quotient wieder auf seine frühere Höhe zurückgekehrt.

3. Bei Berücksichtigung kleinerer (12stündiger) Perioden zeigt sich eine starke Inkongruenz der N- und D-Kurve und dementsprechend ein Schwanken im Quotienten D : N. In der ersten 12stündigen Periode steigt er auf 4,48, um dann in der zweiten 12stündigen Periode auf 1,32, also unter den vor der Fleischzufuhr beobachteten Wert 1,97 abzusinken.

4. Nach der Fleischfütterung sehen wir CO_2-Ausscheidung und O_2-Aufnahme deutlich ansteigen. Mit Sicherheit läßt sich dieser Anstieg in der Periode von 8 bis 11 und 11 bis 3 Uhr nachts auf die Fleischfütterung beziehen. Es ist dies wohl durch die spezifisch-dynamische Wirkung des allerdings nur in geringer Menge mehr zersetzten Eiweißes in diesen Perioden zu erklären. Die Erhöhung des Umsatzes von 3 Uhr nachts an dürfte aber wohl auf Krämpfe zu beziehen sein, die von nun an in Zeiträumen von etwa

Versuch IV u.

Periode	Nahrung	Respiration: C[CO_2] in der Atemluft in toto	stdl.	O_2-Verbrauch in toto	stdl.	R. Q.	Ventilation
2h 15 [1] [3h 05] —6h 09		13,263 [38,491]	12,551	49,983	13,414	0,675	4806,8
6h 09—8h [8h 30]	658 Pferdefleisch	8,398 [30,786]	13,092	32,733	13,926	—	—
8 [8h 30] —11h		10,632 [38,977]	15,591	40,616	16,246	0,694	3104,5
11—3h		18,698 [68,547]	17,137	68,990	17,25	0,696	5189,5
3—7h		20,16 [73,905]	18,476	71,86	17,96	0,744	5051,1
7—7h 40 [8h]		4,917 [18,016]	18,016	17,87	17,87	—	—
7h 40 [8h] —1h		23,95 [87,782]	17,556	88,97	17,79	0,714	6727,0
1—7h		28,833 [105,70]	17,62	108,38	18,06	0,705	7323,5
Total 6h 09—7h	658 Pferdefleisch	116,088	—	429,409	—	—	—

Berechnung der Wärmeproduktion. (Versuch IV.)

	C in der Respiration	Calorien	Wasser-verdampfung	Calorien aus Wasser-verdampfung
aus Eiweiß	3,69	37,0	—	—
aus Fett	9,57	117,7	—	—
aus Kohlehydrat . .	—	—	—	—
Total	13.26	154,7	92,0	5,52
pro Stunde	—	39,7	—	—
pro Stunde und Kilogr.	—	2,15	1,28	0,77

[1]) Respiration erst von 3h 05 an, auf die Zeit von 2h 15 bis 6h 09 berechnet.

(5. u. 6. Juni 1906.)

H_2O durch Lungen u. Haut		Harn									Temperatur	Körpergewicht
		N		C	H	NH_3	D	D:N	C/N nach Abzug des Zucker-C			
in toto	stdl.	in toto	stdl.									
92,0	22,4	2,562	0,640	4,194	0,891	0,544	5,0	1,97	0,856		39,7	18,5
51,0	25,5										40,4	
73,7	29,48											
		7,602	0,608	21,436	5,584	1,856	34,095	4,48	1,039			
128,1	32,0											
123,8	30,9											
20,8	31,2										39,8	17,8
157,5	31,5	6,625	0,552	8,810	2,137	—	8,594	1,32	0,811			
211,9	35,3										39,8	17,1
766,8	—	14,227	—	30,246	7,721	—	42,689	3,00	—		—	Mittel 17,8

Generaltabelle.

Versuch	Gesamt-Calorien	Calorien aus Wasser-verdampfung	Calorien pro kg und Stunde		Anteil der Wasser-verdampfung an der Wärme-abgabe in Proz.
			total	aus Wasser-verdampfung	
I nüchtern	1062,9	425,0	2,44	0,98	40,0
II Dextrose	858,4	278,5	2,40	0,78	32,4
III nüchtern	216,1	75,2	2,10	0,73	34,8
IV nüchtern	154,7	55,2	2,15	0,77	36,2

Tabelle VI. Nüchtern-

Datum	Respiration												
	Periode	C(CO_2) in der Exspiration in Grammen		O_2-Verbrauch in Grammen		R. Q.	Ventilation (reduz.) pro Std.	H_2O durch Lungen und Haut		Periode	Menge	Spez. Gew.
		in toto	stdl.	in toto	stdl.			in toto	stdl.			
23. VIII.	9^h 45 [10^h 45] —1^h 45	10,253 [37,588]	3,42 [12,53]	38,439	12,81	0,707	1280,2	132,1	33,0	—	—	—
23. VIII.	1^h 45—5^h 45	15,054 [55,187]	3,76 [13,80]	54,215	13,55	0,736	1316,6	151,6	37,9	—	—	—
23. VIII.	9^h 45 [10^h 45] —5^h 45	25,307	—	92,654	—	—	—	283,8	35,5	8^h 30— 5^h 45	[1000]	—
27. VIII.	9^h [9^h 30]— 12^h 30	17,486 [64,104]	5,83 [21,37]	67,582	22,53	0,686	1302,1	128,1	36,6	—	—	—
27. VIII.	12^h 30— 4^h 30	23,804 [87,267]	5,95 [21,82]	87,818	21,95	0,719	1329,4	162,6	40,65	—	—	—
27. VIII.	9^h [9^h 30] —4^h 30	41,290	—	155,400	—	—	—	290,7	38,8	8^h 45— 4^h 30	470	1043
28. VIII.	9^h 15 [9^h 45] —12^h 45	13,033 [47,778]	4,34 [15,93]	49,438	16,48	0,699	1309,7	104,5	30,0	7^h 30— 5^h 30	390	1031
28. VIII.	1^h [1^h 30] 5^h 30	18,262 [66,950]	4,57 [16,74]	69,973	17,49	0,692	1235,8	158,2	35,2	—	—	—

einer halben Stunde auftraten und mehrere Sekunden dauerten. In die Periode des Beginnes der Krämpfe fällt ein sehr hoher R. Q. Ob propter hoc und ob der hohe R. Q. mit Zuckerverbrennung etwas zu tun hat, ist kaum möglich anzugeben. Es könnte sich z. B. auch um Verbrennung von im Körper aufgestapelten Acetonkörpern handeln. Die ganze Berechnung der Zersetzung und der Kalorienproduktion wird dadurch unsicher. Wir haben daher auf dieselbe verzichtet.

B. Versuche an Hund Lotti.

Der Hund war ungefähr gleich schwer wie Hund Juno und ebenfalls sehr mager. Es seien hier nur kurz folgende Bemerkungen angeführt, im Übrigen sei auf die Tabelle VI verwiesen.

Bemerkungen:

20. VIII 1906. Letzte Fütterung.

23. VIII. Untersuchung des Hungerumsatzes. Versuch VI.

Der Hund verhielt sich während des Versuches und auch während der folgenden ganz ruhig.

versuche an Hund L.

Harn: N in toto	Harn: N stdl.	Harn: Zucker in toto	Harn: Zucker stdl.	D/N	Körpergewicht	C in der Respiration: aus Eiweiß (nach Abzug der Zucker-Cal)	C: aus Kohlehydrat	C: aus Fett	C: Total	Calorien: aus Eiweiß (nach Abzug der Zucker-Cal)	Calorien: aus Kohlehydrat	Calorien: aus Fett	Calorien: Total	Calorien: pro Stunde	Calorien: pro Std. u. kg	Körpertemperatur Grad	Versuch
—	—	—	—	—	22,40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38,4	
—	—	—	—	—	21,60	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38,7	VI
1,640	0,179	—	—	—	Mittel 22,00	3,21	0,75	21,35	25,31	31,3	7,2	262,6	301,1	43,0	1,91	—	
—	—	—	—	—	20,07	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
—	—	—	—	—	19,64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	VII
6,12	0,790	20,95	2,70	3,42	Mittel 19,86	6,60	—	34,69	41,29	68,5	—	426,7	495,2	70,7	3,60	38,8—39,9	
7,50	0,750	24,32	2,432	3,24	Mittel 19,46	2,84	—	10,19	13,03	29,3	—	125,4	154,7	51,55	2,71	38,5—38,7	VIII
—	0,750	—	2,432	—	Mittel 19,09	3,79	—	14,47	18,26	39,1	—	178,0	217,1	54,3	2,84	38,7—39,1	IX

24\. VIII. Exstirpation des Pankreas (Herr Prof. Enderlen).
25\. VIII. 500 g Fleisch.
27\. VIII. Versuch VII.
28\. VIII. Versuch VIII und IX. Nachher Pferdefleisch.

Die Körpertemperatur verhielt sich während der Untersuchungsperioden folgendermaßen:

Datum	Morgens	Abends	Datum	Morgens	Abends
20. VIII.	—	38,6	27. VIII.	38,8	39,9
21. VIII.	38,5	38,3	28. VIII.	38,5—38,7	39,1
22. VIII.	38,3	38,3	29. VIII.	38,5	39,0
23. VIII.	38,4	38,7	30. VIII.	38,7	38,9
24. VIII.	38,4	—	31. VIII.	38,9	39,1
25. VIII.	38,6	38,9	1. IX.	38,5	39,6
	Operation		3. IX.	40,5	
26. VIII.	39,0	—		tot	

In den letzten Tagen Verdickung in der Umgebung der Naht; keine Eiterung nach außen. Bei der Sektion flächenförmiger Abszeß zwischen

Haut und Muskulatur des Abdomens, fast handtellergroß; einige nekrotische Stellen und kleine Abszeßchen an den Verklebungen zwischen Netz und Duodenum (Unterbindungsstellen); keine Pankreasreste.

Nur Spuren von Aceton gegen das Ende hin. Der Zucker wurde polarimetrisch und titrimetrisch (teils nach Fehling, teils nach Allihn) bestimmt. Die Werte stimmten immer gut überein.

Besprechung der Resultate.

I. Kapitel.

Die Steigerung des Eiweißumsatzes nach der Pankreasexstirpation.

Eine Erscheinung, die ohne weiteres bei der Betrachtung der Tabellen in die Augen fällt, ist die enorme Steigerung der Hunger-N-Ausscheidung nach der Pankreasexstirpation. Wir lassen die einzelnen Versuche tabellarisch zusammengestellt folgen:

Tabelle VII.

Nummer des Versuches	Gewicht	D:N	N in 24 Stunden	N pro kg in 24 Stunden		
Hund Juno vor der Exstirpation[1].						
I. 1. Tag[1]	23,8	—	5,257	0,222		
3. „ [1]	23,5	—	4,735	0,201		
II. 1. „ [1]	23,55	—	3,894	0,166		
3. „ [1]	23,37	—	5,232	0,223	0,214	
III. 1. „ [1]	23,6	—	4,440	0,189		
3. „ [1]	22,8	—	4,689	0,206		
VI. 1. „ [1]	23,75	—	5,230	0,221		3 fach
Nach der Exstirpation.						
I.	21,75	3,27	12,408	0,572		
II. Dextrose	20,4	(3,27)	11,448	0,561		
III.	20,0	(3,27)	12,552	0,637	0,633	
IV.	18,5	1,97	15,350	0,830		
Hund Lotti vor der Exstirpation.						
VI.	22,0	—	4,436	0,202		
Nach der Exstirpation.						4½ fach
VII.	19,86	3,42	18,96	0,953		
VIII.	19,46	3,24	18,00	0,923	0,939	
IX.	19,09	3,24	18,00	0.913		

[1]) Vgl. W. Falta, F. Grote und R. Staehelin, a. a. O.

Die Hungereiweißzersetzung ist also nach der Exstirpation des Pankreas im ersten Fall um das Dreifache, im zweiten Falle um das Viereinhalbfache über die Norm gesteigert. Eine genaue Durchsicht der Literatur lehrt, daß wir es hier, in Versuchen, in denen der Quotient D:N um 2,8 schwankt, mit einer gesetzmäßigen Erscheinung zu tun haben. Es seien hier einige dieser Versuche wiedergegeben, welche im Hungerzustande ausgeführt, und wenigstens soweit mit Körpergewichtsangabe versehen sind, daß sie einen direkten Vergleich mit unseren Versuchen zulassen:

Aus der Arbeit Minkowskis[1]): S. 98. Vers. I. Zweiter Hungertag, 8 kg schwerer Hund D:N = 2,66, N pro 24 Std. = 6,0. N pro 24 Std. und Kilogramm Körpergewicht = 0,75 g. Dritter Hungertag D:N = 266, N pro 24 Std. = 7,6. Vierter Hungertag D:N = 2,72, N pro 24 Std. = 5,1. Bei der raschen Abnahme des Körpergewichtes, die hier stattgefunden haben muß, ist N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht am vierten Hungertag sicher noch über 0,75 g.

Vers. IV. 11 kg schwerer, gut genährter Hund, 24 Stunden vor der Operation zum letzten Male gefüttert; $2^1/_2$ Tage nach der Operation D:N = 2,87. N in 24 Std. = 13,7 g[2]).

Es ließen sich noch Versuche II, III, VII, IX, XXX, XXXI, XXXIII XXXIV heranziehen. Es ist da zwar die Körpergewichtabnahme während der Hungerperioden nicht angegeben, die Zahlen für die N-Ausscheidung am Ende der Perioden sind aber überall enorm hoch und entsprechen ungefähr den eben angeführten.

Weiter mehrere Versuche bei Kaufmann[3]):

Vers. I. 12,2 kg schwerer Hund, D:N = 3,11; N in 24 Stunden = 10,8 g. N in 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,9.

Vers. II. 10,25 kg schwerer Hund, D:N = 2,88; N in 24 Stunden = 7,68; N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,75.

Vers. III. 10,1 kg schwerer Hund, D:N = 4,0; N in 24 Stunden = 9,31; N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,93.

Vers. IV. (Période avancée) 8,7 kg schwerer Hund, D:N = 2,93; N in 24 Stunden = 8,424 g; N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,97.

Aus den Arbeiten Lüthjes seien folgende Versuche angeführt: Versuch I[4]). 11 kg schwerer Hund, am Tage vor der Pankreasexstirpation zum letzten Male gefüttert; am zweiten Tage nach der Exstirpation N in 24 Std. = 8,68 g; D:N = 2,7, N pro 24 Stunden und Kilogramm = wenigstens 0,8 g; oder Versuch II[5]). 13 kg schwerer Hund; D:N = 2,8; vom zweiten bis fünften Tage nach der Exstirpation N in 24 Stunden = 12,66 — 13,33 — 12,94 — 12,99 g; endlich S. 1603. Versuch III. $17^1/_2$ kg schwerer Hund; D:N = 2,8; N in 24 Stunden = 16,6 g.

---

[1]) Minkowski, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 31 (1893).

[2]) Von uns auf 24 Stunden umgerechnet.

[3]) Kaufmann, Compt. rend. soc. biolog., mars 14, 1896.

[4]) H. Lüthje, Ist die Zuckerzerstörung nach Pankreasexstirpation vollständig aufgehoben? Münchn. mediz. Wochenschr., Nr. 36, 1902.

[5]) Derselbe, Die Zuckerbildung im tier. Organism., ebenda Nr. 39, 1902.

In einer Arbeit von Almagia und Embden[1]) findet sich folgendes Beispiel. S. 305: 8,5 kg schwerer Hund; ein Tag nach der Exstirpation des Pankreas D : N = 2,54; N in 24 Stunden = 9,75; am folgenden Tage D : N = 2,95; N = 6,21; am fünften Tage D : N = 2,83; N = 9,36; daher N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht mindestens = 1 g.

Oder S. 307: Drei Tage nach der Pankreasexstirpation D : N = 2,37; N = 3,76; Körpergewicht zu dieser Zeit = 3,1 kg; N pro 24 Stunden und Kilogramm = 1,2.

Endlich seien noch zwei Versuche von Mohr[2]) erwähnt; S. 465: 7,5 kg schwerer Hund (nach 18tägigem Hungern). Exstirpation des Pankreas; nach zwei Tagen D : N = 2,85; N pro 24 Std. = 8,4; N pro 24 Stunden und Kilogramm mindestens 1,1 g.

Und S. 466: 18 kg schwerer Hund; Exstirpation; zwei Tage nachher D : N = 2,85; N in 24 Std. = 15 g; N pro 24 Stunden und Kilogramm mindestens 0,82 g.

Bei den kleineren Tieren zeigen die Zahlen für den täglichen Hungereiweißumsatz pro Kilogramm im allgemeinen höhere Werte als bei den größeren, entsprechend den analogen Verhältnissen bei normalen Tieren. Bei normalen Tieren erhielt E. Voit[3]) folgende Werte:

28,6 kg schwerer Hund schied in 24 Stunden pro Kilogramm aus: 0,18 g N
18,7 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,20 g N
7,2 „ „ „ „ „ „ „ „ „ 0,3 g N.

Wir können zusammenfassend also nochmals sagen: Nach der Pankreasexstirpation tritt eine enorme Steigerung der Eiweißeinschmelzung ein, welche bei maximal ausgebildeter Stoffwechselstörung zum Körpergewicht und zur Körpergröße gleiche gesetzmäßige Beziehungen zeigt, wie unter normalen Verhältnissen.

Diese Steigerung der Eiweißeinschmelzung ist schon kurz nach der Entdeckung des Pankreasdiabetes namentlich von französischen Autoren beschrieben und als Azotorrhöe bezeichnet worden. Die rasche Abmagerung der pankreasdiabetischen Hunde wurde darauf zurückgeführt. Nach Hédon[4]) sollte es sogar in Fällen, bei welchen nach Implantation eines Teiles des Pankreas, also infolge unvollständiger Exstirpation, der Zucker ausblieb, doch zur Azotorrhöe und Kachexie kommen. Diese Symptome sollten daher selbstän-

---

[1]) Almagia und Embden, Über die Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde usw. Diese Beiträge 7 (1905).

[2]) L. Mohr, Über die Herkunft des Zuckers im Pankreasdiabetes des Hundes. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Therap. 2 (1906).

[3]) E. Voit, Zeitschr. f. Biol. 41 (1901).

[4]) Hédon, Arch. d. physiol. 1892, p. 245 u. 617.

dige Erscheinungen der Pankreasfunktion darstellen. Gegen diese Auffassung Hédons wandte sich Minkowski[1]) mit Recht. Minkowski wies darauf hin, daß exakte Stoffwechselversuche bei Hédon nicht vorliegen; die Gefräßigkeit und rasche Abmagerung solcher Hunde erkläre sich aber ohne weiteres aus der Resorptionsstörung infolge Ausfalles des Pankreassaftes. Nun sagt Minkowski weiter, es bestehe allerdings kein Zweifel, daß bei vollständiger Exstirpation ein gesteigerter Eiweißzerfall eintrete; allein die ganze Frage wird von Minkowski im Anhang seiner großen Arbeit über den experimentellen Pankreasdiabetes nur kurz besprochen, und obwohl später Kaufmann[2]) die Frage nochmals aufnahm und die große Muskelschwäche der Tiere mit dem gesteigerten Eiweißzerfall in Zusammenhang brachte, so ist in den Abhandlungen und experimentellen Arbeiten über den Pankreasdiabetes von dieser interessanten Erscheinung kaum mehr die Rede; jedenfalls wird ihr nirgends die Bedeutung zuerkannt, die ihr nach unserer Meinung zukommt, um so mehr als vermehrte N-Ausscheidung sich auch bei manchen Glykosurien findet und speziell bei der Phloridzin-Glykosurie von Lusk[3]) genauer studiert worden ist.

Bevor wir nun auf die Bedeutung dieser Erscheinung näher eingehen, haben wir erst die Frage zu erledigen, ob dieselbe nicht etwa auf eine Infektion zurückzuführen sei. Diese Frage kommt nicht nur für unsere, sondern für alle von uns aus der Literatur zusammengestellten Versuche in Betracht. Denn so gut wie nirgends finden sich in der Literatur des Pankreasdiabetes Angaben über die Körpertemperatur der operierten Tiere; auch fehlt sehr häufig jede Beschreibung des Heilungsverlaufes der Bauchwunde. Bei einseitiger Operation lassen sich aber Eiterungen der Stichkanäle, wie auch Minkowski[4]) erwähnt, fast niemals vermeiden. Untersuchungen aber bei Tieren, denen das Pankreas in mehreren Sitzungen nach vorhergehender Transplantation eines Teiles desselben unter die Bauchhaut herausgenommen wurde (siehe besonders Minkowski[5]), sind nur bei Fütterung ausgeführt worden; solche

[1]) Minkowski, a. a. O., Anhang.
[2]) Kaufmann, a. a. O.
[3]) Gr. Lusk, Zeitschr. f. Biol. 42, 43 (1901) und Reilly, Nolan and Lusk, Americ. Journ. of Physiol. 1, 307, 1895.
[4]) Minkowski, Über die Zuckerbildung im Organismus beim Pankreasdiabetes, Pflügers Arch. 111 (1906).
[5]) Derselbe, Untersuchungen über Diab. mell. usw. A. a. O.

im Hungerzustand haben wir nicht auffinden können. Ein gleiches Bedenken gilt vielleicht auch für manche Versuche an Phloridzinhunden, bei denen an den Injektionsstellen so häufig Abszesse entstehen. Auch hier sollten Angaben über die Temperatur der Versuchstiere niemals fehlen. Wir werden auf die Bedeutung der Infektion für die Stoffwechselvorgänge später bei der Besprechung des Gesamtumsatzes ausführlich zu sprechen kommen. Daß aber in den von uns mitgeteilten Fällen bei der Entstehung der enormen Eiweißeinschmelzung der Infektion eine wesentliche Rolle zukommt, glauben wir, wenn wir auch den definitiven Gegenbeweis momentan nicht zu erbringen in der Lage sind, ablehnen zu können. Es handelt sich ja in unseren Fällen, und ebenso wohl auch in den der Literatur entnommenen Versuchen nicht um Allgemeininfektionen, um Pneumonien oder Peritonitiden, sondern sicherlich — wenigstens in den ersten vier bis fünf Tagen nach der Pankreasexstirpation — um leichte Eiterungen der Stichkanäle; in sicher fieberfreien Perioden, wie z. B. im Versuch VIII, bleibt die Eiweißeinschmelzung auf völlig gleicher Höhe; der gesteigerte Eiweißzerfall ist überhaupt zu enorm und die vorhin geschilderte Beziehung zu Körpergewicht und Körpergröße zu konstant.

Vor allem aber ist es ein Moment, welches den Zusammenhang zwischen dem gesteigerten Eiweißzerfall und dem Ausfall der Pankreasfunktion sehr deutlich illustriert: die fast überall zutage tretende Abhängigkeit der Größe des Eiweißzerfalles von der Höhe des Quotienten D:N. Diese Abhängigkeit besteht nach zwei Seiten.

1. Der vermehrte Eiweißzerfall setzt nicht unmittelbar nach der Exstirpation in voller Intensität ein, sondern die N-Ausscheidung pro Kilogramm Körpergewicht steigt ganz allmählich und gleichsinnig mit dem Quotienten D:N. Beispiele hierfür finden sich schon bei Minkowski, so in den Versuchen I bis III, in welchen die Tiere 24 Stunden vor der Operation zum letzten Male gefüttert worden waren. Anders müssen sich natürlich Tiere verhalten, die wie im Versuch IV bei Minkowski vor der Exstirpation reichlich Kohlehydrate aufgestapelt hatten, da hier noch mehrere Tage nach der Exstirpation der Zucker nicht aus dem Eiweiß allein stammt.

Auch in unseren Versuchen war das oben geschilderte Verhalten ausgeprägt:

Hund Juno.

	D:N	N pro 24 Stunden	N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht
Vor der Exstirpation . . .	—	5,136	0,214
29. V. Exstirpation	—	—	—
30. V.	0,79	8,112	0,356
31. V.	3,28	13,44	0,605

2. **Der gesteigerte Eiweißzerfall sinkt mit dem Quotienten D:N wieder ab.** Hiervon gibt es allerdings Ausnahmen, auf die wir im II. Kapitel zu sprechen kommen werden.

Als Beispiele für Punkt 2 seien angeführt:

a) Vers. IX bei Minkowski (a. a. O.).

Datum	Körpergewicht	D:N	N pro 24 Stunden	N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht
8. VIII.	7,5	2,43	5,04	0 672
9. VIII.	—	1,92	4,04	—
10. VIII.	7,2	1,35	2,88	0,400
11. VIII.	6,9	7,24 (20 g Dextr.)	2,90	0,42
12. VIII.	6,6(?)	1,04	1,68	0,255(?)

b) Ein Versuch bei Lüthje[1]).

11 kg schwerer Hund wird am 14. April zum letzten Male gefüttert, am 15. April Exstirpation des Pankreas.

Datum	D:N	N (N pro kg Körpergewicht = mindestens 0,8)	Datum	D:N	N (N pro kg Körpergewicht = mindestens 0,8)
17. IV.	2,7	8,68	21. IV.	0,6	8,50
18. IV.	2,1	8,48	22. IV.	1,0	3,17
19. IV.	1,9	6,60	23. IV.	0,11	4,60
20. IV.	1,8	8,29			

Der Zucker verschwindet nun; später treten vorübergehend nochmals geringe Mengen auf. Die N-Ausscheidung stellt sich rasch auf etwa 1,86 g N

[1]) H. Lüthje, Ist die Zerstörung des Zuckers nach Pankreasexstirpation vollständig aufgehoben? Münchn. mediz. Wochenschr. 36 (1902).

pro Tag ein. Der Hund wurde später getötet. Bei der Sektion fanden sich bei mikroskopischer Untersuchung Reste gut erhaltenen Pankreasgewebes.

Ein weiteres Beispiel bei Lüthje ist Versuch I in Nr. 39 der Münchn. mediz. Wochenschr. 1902, S. 1601.

c) Ein Versuch bei Almagia und Embden[1]).

Anfangsgewicht des Hundes 6 kg; Hunger.

D:N	N (N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 1,24 g)	D:N	N (N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 1,24 g)
2,96	7,42	1,99	4,56
2,53	5,93	1,08	3,50
1,80	4,82		(N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,67 g [?])
1,31	6,62		

In 13 Tagen nahm der Hund um 2,1 kg, in 5 Tagen daher — gleichmäßige Abnahme vorausgesetzt, was sehr wahrscheinlich ist — um 0,8 kg ab, daher betrug das Körpergewicht am Ende des angeführten Versuches etwa 5,2 kg; daher N pro 24 Stunden und Kilogramm Körpergewicht = 0,67.

Die Resultate der bisherigen Untersuchungen und Überlegungen lassen sich in folgenden Sätzen zusammenfassen.

1. Die völlige Ausschaltung des Pankreas aus dem Stoffwechsel führt zu einer enormen Steigerung des Eiweißzerfalles, der die gewöhnliche Hungerzersetzung um 300 bis 500 Proz. übertreffen kann[2]).

2. Das neue Niveau, auf welches sich die Hungereiweißzersetzung pro Kilogramm Körpergewicht nach der Exstirpation des Pankreas einstellt, scheint für jedes einzelne Individuum für einige Zeit sehr konstant zu sein. Daß die Intensität der Steigerung bei verschiedenen Individuen in gewissem Grade verschieden sein kann, dürfte vom Ernährungszustande abhängen, ähnlich wie die Intensität der Hungereiweißzersetzung beim normalen Tiere vom Fettgehalt desselben abhängig ist.

3. Die Störung im Eiweißhaushalt entwickelt sich parallel mit der im Zuckerhaushalt erst im Verlaufe einiger Tage nach der Exstirpation zur vollen Höhe.

4. Bei unvollständiger Pankreasexstirpation geht mit dem Sinken des Quotienten D:N ein Abfallen des gesteigerten Eiweißzerfalles einher, und mit dem Verschwinden des Zuckers aus dem Harn

[1]) Almagia u. Embden, a. a. O., S. 304.

[2]) Lusk (a. a. O.) fand bei der Phloridzin-Glykosurie der Hunde eine Steigerung um 450 Proz. (absolut, ohne Beziehung aufs Körpergewicht).

scheinen sich auch im Eiweißhaushalt wieder völlig normale Verhältnisse herzustellen.

Es erhebt sich nun die Frage, wie diese enorme Steigerung des Eiweißzerfalles nach der Pankreasexstirpation zu erklären sei. Hier unterliegt es wohl keinem Zweifel, daß der vollständige Mangel der Kohlehydrate in erster Linie die Ursache ist. Bekanntlich vermag kein N-freies Nahrungsmittel Eiweiß in höherem Grade einzusparen als Kohlehydrat. Fehlen die Kohlehydrate in der Nahrung ganz, so wird dadurch das Fett als Eiweißsparmittel stark entwertet. Kleine Mengen von Kohlehydraten sind — wie Landergreen[1]) postuliert — immer notwendig, um die Zersetzungsprozesse in irgend einer Weise, für die wir noch keine greifbare Vorstellung haben, deren Ursache aber vielleicht in der chemischen Konstitution der Kohlehydrate, besonders im Besitze zahlreicher Hydroxylgruppen[2]), erblickt werden kann, einzuschränken. Bekommt der Organismus diese kleine Menge von Kohlehydraten nicht in der Nahrung und sind die Glykogendepots erschöpft, so bleibt immer noch das zerfallende Körpereiweiß als Zuckerquelle übrig. Die Wichtigkeit dieser letzten Zuckerquelle für den Eiweißhaushalt kommt nun — diese Schlußfolgerung ist wenigstens sehr verlockend — in eklatanter Weise beim Pankreasdiabetes zum Ausdruck; denn fallen auch diese wenigen Gramme von Kohlehydraten aus, so tritt ein enormer Eiweißzerfall ein. Die Kohlehydrate sind — wenn ein Bild gestattet ist — das Öl für die Maschine, ohne welches das Protoplasma nur unter großer Abnutzung arbeiten kann.

Ist es nun der Ausfall der Kohlehydrate allein, welcher den Eiweißzerfall hervorruft, oder kommt noch die Ausschaltung einer anderen spezifischen Pankreasfunktion in Betracht? Ferner, geht mit der Erhöhung des Eiweißumsatzes ein Sinken, Gleichbleiben oder Steigen des Fettumsatzes einher? — Bevor wir uns diesen Fragen zuwenden, müssen wir erst einen weiteren Punkt diskutieren.

II. Kapitel.

Über die Frage der Zuckerverbrennung beim Pankreasdiabetes.

Minkowski hat in seiner großen Arbeit den Satz aufgestellt, daß nach totaler Exstirpation des Pankreas die Verbrennung des

[1]) E. Landergreen, Untersuchungen über die Eiweißumsetzung des Menschen. Skandinav. Arch. f. Physiolog. 14 (1903).

[2]) Voit u. Korkunoff, Zeitschr. f. Biol. 32 (1895).

Traubenzuckers vollständig aufgehoben sei. Dieser Satz stützt sich auf Versuche, in welchen Dextrose im Hungerzustande gereicht oder zu einer bestimmten Kost zugefügt wurde; es erschien immer die ganze Dextrosemenge wieder im Harn. Nur in einzelnen Versuchen mit sehr großen Mengen blieb der Anstieg der Zuckerausscheidung hinter der Einfuhr etwas zurück; hier konnte man aber sehr gut annehmen, daß diese kleinen Mengen von Dextrose im Darm zerstört oder nicht resorbiert worden seien. Unser Versuch II hat nun zu dem bemerkenswerten Resultat geführt, daß auch bei Zufuhr ganz abundanter Mengen von Dextrose eine Verbrennung in irgend nennenswertem Maßstabe nicht stattfindet, obwohl nicht der gesamte Zucker wieder im Harn erschien. Die Differenz zwischen Einfuhr und Mehrausscheidung im Harn war sogar nicht unbeträchtlich. Da die Ausnutzung im Darm gut war, so bleibt nichts anderes übrig, als anzunehmen, daß der Zucker im Blut und in den Geweben retiniert wurde, und daß sich die Nieren vorübergehend auf ein höheres Blutzuckerniveau einstellten. Nun hat aber schon Minkowski angegeben, daß der Quotient D:N gegen den Tod der Tiere hin, besonders wenn nur wenig oder gar keine Nahrung mehr zugeführt wurde, abzusinken pflegt. Minkowski deutet dies durch Kachexie der Tiere, bzw. durch mangelhafte Zuckerbildung. Das ist eine Hypothese, die sich bisher durch keine einzige Tatsache stützen läßt. Thiroloix[1]) behauptete dann später, daß pankreasdiabetische Hunde den Zucker sogar ganz verlören, wenn man sie hungern ließe. Dem gegenüber betonte Kaufmann[2]) (übereinstimmend mit Minkowski), daß dies nur bei Tieren mit unvollständiger Exstirpation des Pankreas der Fall sei; bei vollständiger Exstirpation verschwände der Zucker nur unmittelbar vor dem Tode, wenn die Tiere kühler würden. Daß auch dann, wenn der Operateur die volle Überzeugung hat, das ganze Pankreas herausgenommen zu haben, ja selbst dann, wenn bei der Autopsie makroskopisch vom Pankreas nichts mehr zu sehen ist, doch bei der mikroskopischen Untersuchung unter Umständen Reste von Pankreasgewebe gefunden werden können, darauf hat Lüthje[3]) hingewiesen. In dem betreffenden Versuch war der Quotient D:N allmählich gesunken und die Glykosurie endlich verschwunden; gleichzeitig ging auch der gesteigerte

---

[1]) Thiroloix, Compt. rend. soc. biol. 1894.

[2]) Kaufmann, daselbst 1896, février.

[3]) H. Lüthje, Ist die Zuckerzerstörung nach Pankreasexstirpation vollständig aufgehoben? Münchn. mediz. Wochenschr. 36 (1902).

Eiweißzerfall allmählich zu normalen Werten zurück (vgl. I. Kapitel, S. 219). Diese Erfahrungen Kaufmanns und besonders Lüthjes berechtigen uns daher, Fälle, die ein frühzeitiges Heruntergehen des Quotienten D:N zeigen, mit Mißtrauen zu betrachten und als Fälle mit unvollständiger Pankreasexstirpation anzusehen.

Es fragt sich aber nun, wie das Heruntergehen des Quotienten D:N, das bei völlig sicherer Totalexstirpation des Pankreas unmittelbar vor dem Tode zu beobachten ist, zu erklären sei. Solche Fälle berichtet schon Minkowski; auch in unserem Falle I beginnt fünf Tage vor dem Tode der Quotient D:N abzusinken, obwohl hier die vollständige Exstirpation fraglos ist. Endlich berichtet Lüthje[1]) über einen Fall, bei dem mit dem Pankreas der Dünndarm bis tief ins Jejunum hinein reseziert worden war; die Darmenden wurden dann eingestülpt und hierauf die Enteroanastomose zwischen hinterer Darmwand und einer Dünndarmschlinge vorgenommen; eine erhebliche Gallenstauung soll bis zum Tode des Versuchstieres nicht eingetreten sein. Der Hund hungerte seit dem 7. August und wurde am 11. August operiert.

Die Verhältnisse gestalteten sich nun folgendermaßen:

Datum	Zeit	D	N	D:N	N pro Stunde
12. VIII.	(23 Stunden post operat.)	13,5	7,17	1,9[2])	0,312[2])
12. VIII.	(abends 10 Stdn.)	9,0	4,28	2,1	0,428
13. VIII.	(23 Stunden)	18,0	9,38	1,9	0,408
14. VIII.	(16 Stunden)	4,0	6,28	0,61	0,418
15. VIII.	(nachm. 30 Stdn.)	—	1,98	—	0,006
	In 102 Stunden	44,5	29,33	—	—

Am 15. Aug. Blutentnahme; in dem enteiweißten Blut starke Trommersche Probe. Zuckergehalt = 0,312 Proz. In der Nacht vom 16. auf 17. Aug. Tod.

Lüthje glaubt durch diesen Versuch den Beweis erbracht zu haben, daß der völlig pankreaslose Hund noch Zucker zu verbrennen vermag. Es scheint uns jedoch die Beweisführung nicht zwingend; vielmehr scheint alles darauf hinzudeuten, daß der Hund vor dem Tode Zucker zu retinieren vermag; ja es wäre nicht unmöglich, daß der ganze „fehlende“ Zucker im Hunde Platz gehabt hätte. Unter der Annahme, daß die Zuckerbildung aus Eiweiß

[1]) H. Lüthje, Ist die Zuckerzerstörung nach Pankreasexstirpation vollständig aufgehoben? Münchn. med. Wochenschr. 36 (1902).

[2]) Von uns aus den Zahlen Lüthjes berechnet.

vom 12. August abends immer in dem Verhältnis 2,8 vor sich gegangen wäre, würden um 27,39 g D zu wenig ausgeschieden worden sein. Leider ist nun das Körpergewicht des Hundes nicht angegeben, es heißt nur: „großer männlicher Hund“. Nehmen wir aber an, der Hund hätte 20 kg gewogen und zu 60 Proz. aus Wasser bestanden, so hätten im Blut und in den Säften $12000 \times 0,312 = 37,44$ g D Platz gehabt.

Der Hund zeigt überdies eine andere Erscheinung, die uns gegen die Annahme einer gegen das Ende hin zunehmenden Zuckerverbrennung zu sprechen scheint. Das Absinken des Quotienten D:N geht nämlich nicht parallel mit dem Absinken der N-Ausscheidung. Der Quotient ist schon auf 0,61 herabgesunken, während die pathologische Eiweißeinschmelzung noch auf voller Höhe steht (0,418 g N pro Stunde); erst jetzt erfolgt der rapide Absturz der N-Ausscheidung, wie er prämortal oft zu finden ist. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse in unserem Versuche IV. Auch hier ist der Quotient D:N schon abgesunken, die Eiweißeinschmelzung ist dagegen noch im Ansteigen begriffen. Die Bestimmung des Gaswechsels ergibt, daß der Respirationsquotient sehr tief steht. Würde das Absinken des Quotienten D:N eine wirklich stattgehabte Verbrennung von Zucker anzeigen, so hätte der Respirationsquotient steigen müssen.

Wir möchten, um nicht mißverstanden zu werden, betonen, daß wir die eben entwickelte Auffassung nicht als bewiesen ansehen; wir glauben aber, daß sie vorderhand den Tatsachen gerecht wird, um so mehr als durch die Untersuchungen von Liefmann und Stern[1]) gezeigt wurde, daß beim menschlichen Diabetes offenbar ähnliche Verhältnisse vorkommen, daß hier mit der Dauer des Diabetes die „Zuckerdichtigkeit“ der Nieren zunimmt, der Blutzucker sich auf ein höheres Niveau einstellt, ja selbst ähnlich wie im Versuch Lüthjes der Blutzucker zu einer Zeit, wo keine Glykosurie besteht, deutlich erhöht gefunden werden kann.

Wir müssen daher auch die von Lüthje auf Grund des vorhin geschilderten Versuches geäußerte Vermutung, daß durch den Zerfall von Nahrungseiweiß und organisiertem Eiweiß die Zuckerausscheidung in verschiedener Weise beeinflußt werde — eine Auffassung, welche zu der von Minkowski aufgestellten Lehre in vollem Widerspruch steht — für unbegründet halten. Denn wir sehen den Quotienten D:N bei völlig sicherer Totalexstirpation des Pankreas auch ohne jede Nahrungszufuhr viele Tage lang auf

[1]) E. Liefmann und R. Stern, Über Glykämie und Glykosurie. Biochem. Zeitschr. 1, Heft 4, 1906.

voller Höhe verweilen (zahlreiche Beispiele bei Minkowski; auch unser Fall Juno). Es werden dabei dauernd enorme Mengen von N ausgeschieden, so daß es ganz unmöglich ist, anzunehmen, daß diese großen Mengen N nicht aus organisiertem Eiweiß stammten. Wenn aber der Quotient D:N einmal im Absinken begriffen ist, und nun Eiweißzufuhr zu einer Erhöhung des Quotienten D:N führt, so daß das alte Verhältnis 2,8 sich wieder einstellt (Beispiele: Fall Juno, mehrere bei Minkowski u. a.), so beweist dies für ein verschiedenes Verhalten von organisiertem Körper- und Nahrungseiweiß gar nichts. Denn, handelt es sich um Fälle von unvollständiger Pankreasexstirpation, so ist ohne weiteres verständlich, daß Mehrangebot von zuckerbildendem Material die Zuckerausscheidung wieder in die Höhe treibt. Hier dürften die Verhältnisse ähnlich liegen wie in der Pathologie des menschlichen Diabetes, wo erfahrungsgemäß die Inanition die Assimilationskraft für Kohlehydrate zu steigern, erneute Nahrungszufuhr sie wieder herabzudrücken pflegt, wobei das Eiweiß in den schweren Fällen einen besonders intensiven Einfluß auszuüben scheint (Falta und Gigon[1]). In Fällen aber, bei denen es sich nach unserer Annahme um bloße Zuckerretention handeln würde, scheint es verständlich, daß bei erneuter Nahrungszufuhr und dadurch bedingter plötzlicher Steigerung des Blutzuckergehaltes auch die Glykosurie entsprechend steigt, da anzunehmen ist, daß die Nieren sich nur ganz allmählich auf ein höheres Niveau einstellen.

Die Inkongruenz im Ablauf der D- und N-Kurven nach Fleischfütterung, wie sie für die Phlorizinglykosurie von Lusk[2]), für den Pankreasdiabetes von Berger[3]) beschrieben worden ist, findet sich auch in unserem Versuch V. Eine Besprechung dieser Verhältnisse mit Hinblick auf ähnliche Versuche beim menschlichen Diabetes soll an anderer Stelle erfolgen[1]).

III. Kapitel.

Der Gesamtumsatz beim Pankreasdiabetes.

Wir kommen nun zur Besprechung des Gesamtumsatzes vor und nach der Pankreasexstirpation.

---

[1]) W. Falta, Über die Gesetze der Zuckerausscheidung beim Diab. mell. Zeitschr. f. klin. Mediz. Spätere Mitteilung.

[2]) Lusk, Phlorizindiabetes in dogs. Americ. Journ. of Physiol. 1898, p. 395.

[3]) H. Berger, Experim. Beitr. zum Pankreasdiabetes bei Hunden. Inaug.-Dissert. Halle 1901.

Tabelle VIII.

Nummer des Versuches	Kalorien in 24 Stunden	Kalorien pro Stunde	Kalorien pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht	Zuwachs an Kalorien pro Kilogramm Körpergewicht in Prozenten der Normal-Kalorienproduktion
		Hund Juno vor der Exstirpation.		
I. 1. Tag[1]	904	37,7	1,58	—
3. „ [1]	897,0	37,4	1,60	—
II. 1. „ [1]	899,6	37,4	1,60	—
3. „ [1]	889,8	37,1	1,55	—
III. 1. „ [1]	838,3	34,9	1,48	—
3. „ [1]	817,6	34,07	1,53	—
IV. 1. „ [1]	946,2	39,6	1,66	—
	—	—	Mittel = 1,57	—
		Nach der Exstirpation.		
I.	1274,4	53,1	2,44	54,4
II. (150 g Dextrose)	1177,2	49,05	2,40	51,9
III.	1036,8	43,2	2,10	32,9
IV.	936,0	39,0	2,11	32,9
		Hund Lotti vor der Pankreasexstirpation.		
IV.	1032,0	43,0	1,91	—
		Nach der Exstirpation.		
VII. . . .	1696,8	70,7	3,60	88,5
VIII. . . .	1237,2	51,55	2,71	41,8
IX. . . .	1303,2	54,3	2,84	49,2

Die Tabelle zeigt in allen Versuchen nach der Pankreasexstirpation eine wesentliche Steigerung des Gesamtumsatzes. Bei Hund Juno beträgt das Mittel aus sieben Versuchen im Hungerzustande 1,58 Cal pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht; nach der Pankreasexstirpation schwanken die entsprechenden Werte zwischen 2,44 und 2,10; der Zuwachs beträgt daher 54,4 — 32,9 Proz. Bei Hund Lotti liegen die Verhältnisse ähnlich. Vor der Exstirpation werden pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht produziert: 1,91 Cal, nach der Exstirpation 3,60 — 2,71. Der Zuwachs schwankt zwischen 88,5 und 41,8 Proz.

Das eben besprochene Resultat unserer Versuche widerspricht der bisherigen Annahme, daß der Gesamtumsatz beim Pankreas-

[1]) Versuche aus unserer Arbeit: Versuche über Kraft- und Stoffwechsel des Hundes usw. Diese Beiträge 9, 333.

diabetes nicht erhöht sei; es fragt sich nur, ob diese bisher allgemein gültige Annahme experimentell genügend gestützt ist. Sie fußt auf Respirationsversuchen, die verhältnismäßig alten Datums sind. Es sind dies einmal die Versuche von Weintraud und Laves[1]). Die Anordnung dieser Versuche ist nicht zweckmäßig. Der Hund wurde vor und nach der Pankreasexstirpation immer nur in gefüttertem Zustande untersucht; auch fehlt für die Tage mit gemischter Nahrung die genaue Angabe der Nahrungszufuhr; selbst bei dem mit „nihil" bezeichneten Versuch, der an einem Nachmittag angestellt wurde, war der Hund am Morgen desselben Tages mit Fleisch und Amylum gefüttert worden. Besonders sind es aber methodische Bedenken, die sich gegen die Versuche erheben lassen, wie die Verfasser selbst in ihrer Arbeit betonen.

Bei der Arbeit von Kaufmann[2]) sind methodische Bedenken noch mehr am Platze.

Theoretisch ist nun zweifellos eine Steigerung des Umsatzes beim Pankreasdiabetes zu erwarten, und zwar aus der Steigerung des Eiweißumsatzes. Denn nach Rubner[3]) muß jede Steigerung des Eiweißumsatzes infolge der spezifisch dynamischen Wirkung des Eiweißes zu einer Steigerung des Gesamtumsatzes führen. Diese beträgt nach Rubner 31 Proz. des Kalorienwertes des mehr zersetzten Eiweißes, d. h. das Eiweiß kann bei Ausschaltung der chemischen Wärmeregulation — diese Bedingung wurde in unseren Versuchen durch genaue Einhaltung einer Temperatur von 28 bis 30° C im Respirationsraum erfüllt — nur mit 69 Proz. seines Kalorienwertes Fett einsparen, die übrigen 31 Proz. steigern bloß den Umsatz und gehen so für den Wärmehaushalt des Organismus verloren. Tatsächlich hat Rubner[4]) bei der Phlorizinglykosurie eine derartige Steigerung des Umsatzes beobachtet. Lusk[5]) kam allerdings zu einem anderen Resultat. Seine Versuche sind aber von ihm, wie uns scheint, nicht richtig gedeutet worden[6]).

---

[1]) Weintraud u. Laves, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 629 (1894).
[2]) Kaufmann, Compt. rend. soc. biol. mars 14, 1896.
[3]) Rubner, Gesetze des Energieverbrauches.
[4]) Rubner, Ebenda S. 370.
[5]) Lusk, Zeitschr. f. Biol. **42**, 31 (1901).
[6]) Lusk hat in seinem Versuch die Abnahme des Körpergewichtes nicht berücksichtigt. Der Hund wog vor der Erzeugung der Phlorizinglykosurie 12,98 kg (2. April). Der erste Respirationsversuch ist nach 24 stündigem Hungern, also am 3. April ausgeführt worden. Die Gesamt-Kalorienproduktion betrug pro 24 Stunden 606,81 Cal; also etwa 46,67 Cal pro Kilogramm Körpergewicht. Der zweite Respirationsversuch fällt auf den fünften Glykosurietag. Hier ist leider das Körpergewicht nicht angegeben; da aber der Hund am

Wir haben also in unseren Versuchen eine Erhöhung des Gesamtumsatzes zu erwarten, welche 31 Proz. des Kalorienwertes des mehr zersetzten Eiweißes ausmacht. Die Berechnung sei an folgenden Beispielen durchgeführt:

Versuch I. (Hund Juno.)

Die N-Ausscheidung betrug pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht
vor der Exstirpation = 0,008 33
nach der Exstirpation = 0,023 83

Es wurden also mehr ausgeschieden 0,015 50 g N, entsprechend 0,3875 Cal.

Die Steigerung des Gesamtumsatzes hätte daher betragen sollen:
$0{,}3875 \times 0{,}31 = 0{,}1201$ Cal pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht.

Vor der Exstirpation wurden pro Stunde und Kilogramm erzeugt = 1,58 Cal
Nach „ „ „ „ „ „ „ „ = 2,44
Die Steigerung des Gesamtumsatzes beträgt daher . . . . 0,86 Cal
pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht.

Versuch IV. (Hund Juno.)

N pro Stunde und Kilogramm vor der Exstirpation = 0,008 33
„ „ „ „ „ nach „ „ = 0,034 58
Plus = 0,026 25 g N,
entsprechend 0,656 Cal.

Erwartete Steigerung des Gesamtumsatzes = $0{,}656 \times 0{,}31 = 0{,}193$ Cal pro Stunde und Kilogramm.

Gefundene Steigerung des Gesamtumsatzes = $2{,}11 - 1{,}58 = 0{,}53$ Cal pro Stunde und Kilogramm.

Versuch VIII. (Hund Lotti.) Fieberfreie Periode.

N pro Stunde und Kilogramm vor der Exstirpation = 0,008 417
„ „ „ „ „ nach „ „ = 0,038 46
Plus = 0,030 04 g N,
entsprechend 0,751 Cal.

---

7. Phlorizintag (8. April) nur noch 9,8 kg wog, also um 3 kg abgenommen hatte, so ist — konstante Abnahme des Körpergewichtes vorausgesetzt, was sehr wahrscheinlich ist — bis zum 5. Phlorizintag eine Abnahme um 2 kg zu erwarten. Wir kommen so für den Tag des zweiten Respirationsversuches zu der Zahl 11 kg. Die Gesamtkalorienproduktion betrug nun pro 24 Stunden 605,77 Cal, also 55,07 Cal pro Kilogramm Körpergewicht.

Die Steigerung des Gesamtumsatzes ist sogar größer, als der spezifisch dynamischen Wirkung des mehr zersetzten Eiweißes entsprach. Für den 11 kg schweren nicht phlorizinvergifteten Hund wäre eine Gesamtkalorienproduktion zu erwarten gewesen

von $46{,}67 \times 11 = 513{,}37$ Cal
Es wurden gefunden . . . 605,77 „
Das Plus betrug daher . . 92,40 Cal.

Die Eiweißzersetzung war gestiegen von 20,19 auf 67,38 g Eiweiß. Das ist ein Plus von 47,19 g Eiweiß = 7,55 g N oder 188,75 Cal. Es wäre also eine Steigerung des Umsatzes zu erwarten gewesen von $188{,}75 \times 0{,}31 = 58{,}51$ Cal.

Erwartete Steigerung des Gesamtumsatzes = 0,751 × 0,31 = 0,2328 Cal pro Stunde und Kilogramm.

Gefundene Steigerung des Gesamtumsatzes = 2,71 — 1,91 = 0,80 Cal pro Stunde und Kilogramm.

Versuch IX. (Hund Lotti.) Fieber.

N pro Stunde und Kilogramm vor der Exstirpation = 0,008417
" " " " " nach " " = 0,039 30
Plus = 0,03088 g N,

entsprechend 0,772 Cal.

Erwartete Steigerung des Gesamtumsatzes = 0,772 × 0,31 = 0,239 Cal pro Stunde und Kilogramm.

Gefundene Steigerung des Gesamtumsatzes = 3,60 — 1,91 = 1,69 Cal pro Stunde uud Kilogramm.

Die Berechnung der übrigen Versuche führt zu ähnlichen Resultaten. Wir finden jedesmal eine Steigerung des Gesamtumsatzes, die wesentlich höher ist, als nach der Erhöhung des Eiweißumsatzes zu erwarten gewesen wäre. Es zeigt sich daher in jedem Versuche nach der Pankreasexstirpation nicht nur eine Erhöhung des Eiweißzerfalles, sondern auch eine Steigerung der Fetteinschmelzung[1]).

Bei der Besprechung des Decursus morbi haben wir erwähnt, daß die Wundheilung bei unseren Versuchstieren nicht per primam erfolgte. Es bildeten sich kleine Abszesse der Stichkanäle; bei beiden Hunden trat gegen das Ende sogar eine mehr ausgebreitete Infiltration der Bauchdecken auf. Es ergibt sich daher die Frage, wie weit die von uns beobachtete Steigerung des Umsatzes auf die Infektion zu beziehen sei. Es ist dabei einerseits zu bedenken, daß wenigstens zur Zeit, als die Respirationsversuche angestellt wurden, die Infektion nur eine lokale war und daß auch nach dem Verenden der Tiere bei der Sektion weder Pneumonien noch Peritonitiden gefunden wurden; andererseits finden wir aber doch schon zur Zeit der Respirationsversuche teilweise nicht unbeträcht-

[1]) Es sei bei dieser Gelegenheit erwähnt, daß dieser Befund auch für die viel diskutierte Frage der Zuckerbildung aus Fett, soweit der experimentelle Pankreasdiabetes in Betracht kommt, von Interesse ist. Bisher wurde der Einwand, daß vermehrte Fettzufuhr niemals zu einer Steigerung der Zuckerausscheidung führe, von den Vertretern dieser Lehre mit dem Hinweis zu entkräften versucht, daß vermehrte Fettzufuhr noch nicht eine vermehrte Fettverbrennung bedinge. Aus unseren Versuchen geht jedenfalls so viel hervor, daß vermehrte Fettverbrennung bei totalem Pankreasdiabetes den Harnzucker nicht vermehrt. Denn der Umfang der vermehrten Fettverbrennung ist in unseren Versuchen sehr verschieden groß, der Quotient D:N wird dadurch aber nicht verändert.

liche Temperatursteigerungen. Nur im Versuch VIII ist die Temperatur sicher normal. Es ist daher bemerkenswert, daß auch in diesem Versuche eine bedeutende Steigerung des Umsatzes um 41,8 Proz. über die Norm vorhanden war; auch hier ist sie wesentlich, nämlich um das $3^1/_2$fache größer, als nach der Steigerung des Eiweißumsatzes allein zu erwarten gewesen wäre.

In den Fieberperioden sehen wir den Umsatz noch wesentlich mehr gesteigert; in Versuch VII beträgt die Steigerung sogar 88,5 Proz. Hier haben wir es sicher mit einer Fieberwirkung zu tun.

Die bisher besprochenen Ergebnisse unserer Respirationsversuche lassen eine markante Erscheinung des experimentellen Pankreasdiabetes verständlich erscheinen. Es ist dies der enorm rapide Verfall, den solche Tiere aufweisen. Nach den Zahlen von Kaufmann beträgt der tägliche Gewichtsverlust pankreasloser Hunde das Zwei- bis Dreifache dessen, was normale Hunde im Hungerzustande innerhalb 24 Stunden an Gewicht zu verlieren pflegen. Dieser Gewichtsverlust geht ja bekanntlich mit rasch zunehmender Muskelschwäche einher, so daß die Tiere sich bald kaum mehr auf den Beinen erhalten können. Diese „Schwindsucht" findet ihre Erklärung in zwei Faktoren: 1. in der Steigerung des Eiweißzerfalles und in der dadurch verursachten Steigerung des Gesamtumsatzes im Sinne Rubners und 2. in einer Steigerung der Fettverbrennung. Der letztgenannte Faktor ist wohl zeitweise zum großen Teil auf die die einzeitige Operation fast stets begleitende Infektion der Bauchwunde zurückzuführen [1]). Gehört nun aber auch jene in der fieberfreien Periode beobachtete Steigerung der Fettverbrennung der Infektion an oder handelt es sich hier um eine spezifische, dem experimentellen Pankreasdiabetes zukommende Stoffwechselstörung? Unser Versuch VIII berechtigt uns hier leider nicht zu sicheren Schlüssen in dieser Beziehung, da wir bisher zu wenig Erfahrung besitzen, ob eine derartige Steigerung des Umsatzes auch in fieberfreien Perioden Wirkung der hier vorliegenden Infektion sein kann. Diese Frage

---

[1]) Die gesteigerte Fettverbrennung im Fieber ist bekanntlich früher lebhaft bestritten worden. In jüngster Zeit hat jedoch der eine von uns (R. Staehelin, Arch. f. Hygiene 49) bei einem mit Surratrypanosomen infizierten Hund eine pathologische Fetteinschmelzung mit Sicherheit nachweisen können. Durch die Bestätigung dieses Befundes bei einer ätiologisch weit verschiedenen Infektion in unseren Fällen gewinnt der Befund Staehelins wohl allgemeinere Bedeutung. Freilich läßt sich nicht sagen, wie weit das Fehlen des Pankreas an sich die Wirkung der Infektion auf die Fettverbrennung modifizieren kann.

wird sich vielleicht erst durch Versuche an mehrzeitig operierten Tieren mit völlig glattem Verlauf der Wundheilung entscheiden lassen. Ihre Lösung ist sicher von wesentlicher Bedeutung; denn schon bei der Besprechung des gesteigerten Eiweißzerfalles im Pankreasdiabetes haben wir betont, daß zwar der Ausfall des Eiweißzuckers sicherlich seine Hauptquelle darstelle, daß es aber andererseits nicht ausgemacht sei, ob nicht noch das Fehlen einer anderen spezifischen Wirkung des Pankreas hinzukomme. Der Nachweis eines gesteigerten Fettzerfalles würde sich aber kaum mehr anders deuten lassen, als daß dem Pankreas außer der bekannten Sekretion des Pankreassaftes und der in ihrer Art uns bisher völlig unklaren Beeinflussung des Zuckerverbrauches noch eine andere Funktion zukomme, die sich etwa in der Weise deuten läßt, daß das Pankreas etwas hergibt, das unter normalen Verhältnissen die Fettverbrennung und vielleicht auch die Eiweißzersetzung einschränkt. Die weitere Verfolgung dieses Gegenstandes führt vielleicht zu Beziehungen der einzelnen Blutdrüsen zueinander, eine Anschauung, die in letzter Zeit mehrfach vertreten worden ist.

Herrn Professor His sprechen wir für die Liebenswürdigkeit, mit welcher er uns die Mittel des Laboratoriums für diese Untersuchungen zur Verfügung stellte, unseren ergebenen Dank aus.

XI.

Über die Abspaltung von Aceton aus acetessigsauren Salzen durch Organauszüge und Eiweißkörper.

Von Dr. **Leo Pollak.**

Aus dem k. k. serotherapeutischen Institute in Wien.
(Vorstand: Prof. Dr. Paltauf.)

Die genetischen Beziehungen, welche die als Acetonkörper zusammengefaßten Substanzen untereinander verbinden, sind heute nach der chemischen und physiologischen Seite hin geklärt. Minkowski[1]) konnte zeigen, daß dem diabetischen Organismus einverleibte β-Oxybuttersäure zum Teil in Acetessigsäure und Aceton übergeht, Schwarz[2]), Geelmuyden[3]) u. a. beobachteten die Bildung von Aceton aus verfütterter Acetessigsäure. Dadurch ist der physiologische Beweis geliefert, daß die β-Oxybuttersäure die Muttersubstanz der Acetessigsäure ist und aus letzterer wiederum das Aceton hervorgeht[4]). Eine andere Zuordnung, etwa die umgekehrte Reihenfolge, ist zwar chemisch denkbar, physiologisch aber nicht erwiesen, und nichts drängt zu ihrer Annahme. Während der Übergang der Oxybuttersäure in Acetessigsäure als ein Spezialfall partieller Oxydation dem Verständnis keine weiteren Schwierigkeiten bereitet, ist die Bildung von Aceton aus Acetessigsäure einer eingehenderen Betrachtung wohl wert. Merkwürdigerweise finden sich über die Natur dieses Prozesses in der sonst so reichhaltigen einschlägigen Literatur so gut wie gar keine Bemerkungen. Die Leichtigkeit, mit der freie Acetessigsäure in

---

[1]) Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm. 31 (1893).
[2]) Ebenda 40 (1898).
[3]) Skandin. Archiv f. Phys. 11 (1901).
[4]) Vgl. zu diesem Punkte auch Waldvogel, Acetonkörper 1903, S. 85.

Aceton und Kohlensäure zerfällt, verführte wahrscheinlich zu der Annahme, daß der gleiche Vorgang sich im Organismus abspiele. Im Organismus haben wir es aber nicht mit der freien Säure, sondern mit acetessigsauren Salzen zu tun, deren relative Beständigkeit namentlich in verdünnten Lösungen bekannt ist. Es war daher a priori zu erwarten, daß im Tierköper besondere Einrichtungen gegeben seien, um den Zerfall der acetessigsauren Salze zu Aceton, vielleicht auf fermentativem Wege, zu beschleunigen. Da Versuche an überlebenden Organen schon in mancher Richtung das Verständnis der Stoffwechselvorgänge gefördert haben, ging ich zunächst an das Studium der Frage, ob Organauszüge fermentativ aus Acetessigsäure Aceton abzuspalten vermögen.

Die physiologisch-chemische Literatur enthält bereits mehrere Analogien für einen derartigen Vorgang, der auf die fermentative Absprengung einer Karboxylgruppe hinausläuft. Ich erinnere nur an die längst bekannte Bildung von Methan aus Essigsäure durch Bakterien des Flußschlammes (Hoppe-Seyler[1]), aus neuerer Zeit an die Bildung von Oxyphenyläthylamin aus Tyrosin bei der Autolyse des Pankreas (Emerson[2]), von Cadaverin und Putrescin aus Lysin resp. Ornithin bei der Fäulnis und im Stoffwechsel des Cystinurikers (Ellinger[3]), (Loewy-Neuberg[4]), an die Entstehung von Xylose aus Glukuronsäure durch die Tätigkeit von Fäulnisbakterien (Salkowsky-Neuberg[5]), ohne daß hiermit die Zahl derartiger Reaktionen erschöpft sein dürfte. Weinland[6]) hat in letzter Zeit bei Gelegenheit eines solchen neuen Falles von Abspaltung der Karboxylgruppe für diese Fermente den Namen Karboxylase gebraucht. Man darf aber nicht außer acht lassen, daß es sich trotz der formalen chemischen Gleichheit solcher Prozesse doch um sehr verschiedenwertige Vorgänge handelt. Zweifellos ist die Fermentation der stabilen Essigsäure zu Methan und Kohlensäure für eine chemisch-energetische Betrachtungsweise ganz anders zu werten, als die Abspaltung von Aceton aus den an sich labileren acetessigsauren Salzen. Für die Auffassung der Fermentwirkung als Beschleunigung einer an sich langsam verlaufenden

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 11, 561.
[2]) Diese Beiträge 1, 501.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 324.
[4]) Ebenda 43, 352.
[5]) Ebenda 36, 261.
[6]) Zeitschr. f. Biologie 48 (N. F. 30), 87 (1906).

Reaktion (nach Ostwald-Bredig) handelt es sich im Falle der Essigsäure um einen an sich mit nicht meßbarer Geschwindigkeit verlaufenden Vorgang, bei der Acetessigsäure um eine mit relativ großer Geschwindigkeit spontan vor sich gehende Zersetzung.

Methodik.

Eine Hauptschwierigkeit, die sich der Aufklärung der einschlägigen Verhältnisse entgegenstellte, lag zunächst in der Methodik. Bekanntlich besitzen wir kein Verfahren, um Aceton und Acetessigsäure quantitativ nebeneinander zu bestimmen. Bei der Methode nach Messinger-Huppert wird ja die Acetessigsäure als Aceton mitbestimmt. Schwarz[1]) fand auf diese Weise 92 bis 93 Proz. der zugesetzten Acetessigsäure wieder. Die Versuche desselben Autors, das Aceton mittels Durchlüftung zu entfernen, gaben schon für den Harn keine sehr ermutigenden Resultate. Für meine Zwecke war das Verfahren um so weniger anwendbar, als bei der vielstündigen Durchlüftung — Schwarz schreibt für den Harn 12 Stunden vor — ein eventueller Spaltungsprozeß während der Bestimmung weitere Fortschritte hätte machen müssen, ganz abgesehen davon, daß es sich in meinen Versuchen um beträchtlich größere Acetonmengen handelte, die sich auf diesem Wege wohl überhaupt nicht völlig hätten entfernen lassen. Unbrauchbar ist auch das Verfahren von Oppler[2]), das bereits von Schwarz und Waldvogel zurückgewiesen wurde. Doch scheint mir sein Fehler weniger in dem kolorimetrischen Prinzip zu liegen als in der Voraussetzung, auf der die Bestimmung beruht.

Oppler glaubte in der Menge Normal-Salzsäure, die gerade ausreicht, um die Rotfärbung, welche Eisenchlorid in Acetessigsäureharnen hervorruft, zum Verschwinden zu bringen, einen Maßstab für die quantitative Schätzung zu besitzen. Die zugesetzte n-Salzsäure entreißt aber nicht nur der Acetessigsäure, sondern natürlich allen schwächeren Säuren im Harn das Eisen; die Reihenfolge, in der das geschieht, richtet sich nach der Avidität der betreffenden Säuren, nach dem Gesetze der Massenwirkung u. a., sie hängt also von Bedingungen ab, die im Harn und ebenso auch in meinen Versuchen von Fall zu Fall verschieden sein müssen.

Für die ersten orientierenden Versuche habe ich mir eine kolorimetrische Methode ausgearbeitet, die ebenfalls auf der Rot-

---

[1]) A. a. O.

[2]) Zentralbl. f. inn. Mediz. 16 (1895).

färbung durch Eisenchlorid beruht. Als ich später eine, wie ich glaube, exakte Methode anwandte, zeigten die auf den beiden verschiedenen Wegen gewonnenen Resultate so befriedigende Übereinstimmung, daß ich auch im weiteren Verlauf das kolorimetrische Verfahren als Kontrollprobe beibehielt. Ich ging dabei folgendermaßen vor:

Eine Probe der zu den Versuchen verwendeten Stammlösung von acetessigsaurem Natrium von bekanntem Gehalt (gewöhnlich 6 bis 9 Proz.) wurde auf das genaueste 20 bis 30fach — je nachdem es für den Versuch rechnerisch vorteilhaft war — verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 0,5 ccm zu 5 ccm Wasser zugesetzt und 1 ccm einer 10proz. Eisenchloridlösung hinzugefügt (Testlösung). Die Färbung der Acetessigsäure in dieser Verdünnung ist licht weinrot, der Färbungsgrad eignet sich, meiner Erfahrung nach, in dieser Stärke am besten zum kolorimetrischen Vergleich. Nun wurde die zur Untersuchung auf ihren Gehalt an Acetessigsäure bestimmte Flüssigkeit ihrerseits so weit verdünnt, bis eine der Testlösung genau gleiche Nuance der Rotfärbung — bei gleichem Gehalt an Eisenchlorid — erzielt war und aus der Relation der Verdünnungen der Wert für Acetessigsäure (in Prozenten des ursprünglichen Gehaltes) berechnet. Der Vergleich der Proben wurde stets bei Tageslicht vorgenommen.

Die starke Verdünnung der Ausgangsflüssigkeit, die bei diesem Vorgehen stattfindet, hatte den großen Vorteil, daß die Eigenfarbe derselben und eine eventuelle Trübung in der Mehrzahl der Fälle nicht mehr störend wirken konnte. Wo dies doch der Fall war, half ich mir so, daß ich bei Herstellung der Testlösung neben Wasser eben so viel von der betreffenden Organflüssigkeit zur Verdünnung verwendete, als in der zu vergleichenden Endprobe enthalten sein mußte. Natürlich mußte auch für neutrale Reaktion der Endprobe Sorge getragen werden, wozu in manchen Fällen Zusatz von $^1/_4$ n-Säure nötig war, die dann in die Verdünnungsflüssigkeit mit eingerechnet wurde. Da die Färbung der Acetessigsäure mit Eisenchlorid unbeständig ist, mußte die Testlösung für jeden Versuch frisch bereitet werden.

Die zu den Versuchen verwendete Stammlösung von acetessigsaurem Natron wurde nach dem Vorgange von Bondi und Schwarz[1]) so bereitet, daß der nach Ceresole durch Schütteln mit Baryumcarbonat und wenig Wasser von Dehydracetsäure befreite Acetessigester mit Normal-Natronlauge in geringem Überschusse verseift wurde.

Nach 24 bis 48stündigem Stehen im Kühlraume wurde der nicht verseifte Ester durch Ausschütteln mit Äther vollständig entfernt und dann durch Titration der freien Lauge (Indicator: Phenolphtaleïn) der Gehalt an Acetessigsäure mit einer für meine Versuche ausreichenden Genauigkeit ermittelt. Ich umging so die verlustreiche Ausätherung der freien Säure. Wie schon erwähnt, betrug der Gehalt der zur Verwendung gelangenden Lösungen mit wenigen Ausnahmen 6 bis 9 Proz. Acetessigsäure.

---

[1]) Wiener klin. Wochenschr. 19, Nr. 2 (1906).

Eine Grundbedingung für die Verläßlichkeit der kolorimetrischen Versuche ist natürlich, daß die Stammlösung während der Zeit ihrer Verwendung sich nicht zersetzt. Sie wurde deshalb stets auf Eis oder im Kühlraum aufbewahrt, und ich überzeugte mich durch geeignete Kontrolle, daß die Zersetzung des acetessigsauren Natriums unter diesen Bedingungen äußerst langsam vor sich geht. Trotzdem empfiehlt es sich, die Stammlösung möglichst oft zu erneuern und ihren Gehalt frisch zu bestimmen.

Schließlich seien noch einige Versuche angeführt, die die Empfindlichkeit der Methode beleuchten.

Eine 8,47 proz. Lösung von acetessigsaurem Natrium wird auf das Dreifache verdünnt. Die mittels kolorimetrischen Vergleiches vorgenommene Bestimmung ergibt einen Wert von 33,3 bis 34,4 Proz. des ursprünglichen Gehaltes. Berechnet 33,3 Proz. Dieselbe 8,47 proz. Lösung wird derart verdünnt, daß zu 24 Teilen der Lösung ein Teil Wasser zugesetzt wird. Die kolorimetrische Bestimmung ergibt einen Gehalt von 96,1 bis 92,6 Proz. Berechnet 96 Proz.

Die Methode liefert demnach Werte, die innerhalb einiger Prozente ungenau sein können. Bei Flüssigkeiten mit stärkerer Eigenfarbe, sowie bei besonders starker Abnahme des Gehaltes an Acetessigsäure werden die Fehler der Methode größer.

Zu einer anderen Methode führte folgende Überlegung. Wenn der Zerfall der Acetessigsäure nur unter Bildung von Aceton vor sich geht, dann darf sich der nach Messinger-Huppert bestimmte Wert nicht ändern, zugleich aber muß die Menge der abgespaltenen Kohlensäure einen exakten Maßstab dafür abgeben, wieviel von der vorhandenen Acetessigsäure zerstört wurde. In der Tat ließ sich zeigen, daß die Summe von Aceton und Acetessigsäure in meinen Versuchen im wesentlichen konstant blieb. Da stets bei schwach alkalischer Reaktion gearbeitet wurde, konnte keine Kohlensäure entweichen. Ihre Bestimmung geschah nach dem Pettenkoferschen Verfahren unter Einhaltung der vorgeschriebenen Kautelen.

Die durch verdünnte Essigsäure in Freiheit gesetzte Kohlensäure wurde durch vier mit filtriertem Barytwasser beschickte Vorlagen langsam durchgesaugt, wobei Sorge getragen wurde, die durchstrichene Flüssigkeitsschicht möglichst groß zu gestalten. Ich überzeugte mich durch Bestimmungen an chemisch reinem, wasserfreien Natriumkarbonat in einer Menge, wie sie der maximalen Ausbeute bei meinen Versuchen entsprach, daß bei 3 bis 4 stündigem Luftdurchleiten die berechnete Menge Kohlensäure gefunden wird. Eine allzulange Durchlüftung war nämlich zu vermeiden, um nicht durch Weiterzersetzung der intakten Acetessigsäure während des Versuchs zu hohe Werte zu bekommen. Der Einwand, daß in der sauren Lösung

während der Bestimmung Acetessigsäure zerfallen und in Betracht kommende Kohlensäuremengen abgeben könne, war übrigens leicht experimentell zu widerlegen. Jede in der oben geschilderten Weise hergestellte Lösung von acetessigsaurem Natrium enthält eine kleine Menge Karbonat, da sich schon während der Verseifung (sowie auch bei längerem Stehen im Kühlraume) ein kleiner Teil des acetessigsauren Salzes zersetzt. Nach 2stündiger Durchlüftung bei schwach essigsaurer Reaktion bleibt aber die absorbierte Menge Kohlensäure konstant und steigt auch bei mehrstündiger Weiterführung des Versuches nicht an, ein Beweis dafür, daß, abgesehen von dem von vornherein vorhandenen Karbonat, keine Kohlensäuremengen in Betracht kommen, die etwa durch Spontanzerfall freier Acetessigsäure während der Bestimmung entstehen. Übrigens wurde Essigsäure stets nur bis zu schwach saurer Reaktion zugesetzt.

Die auf diesem Wege gewonnenen Zahlen zeigen nach Umrechnung auf Acetessigsäure mit den Ergebnissen der kolorimetrischen Methode durchwegs befriedigende Übereinstimmung. Bei Umrechnung auf Prozente differieren sie um 3 bis 4 Proz., wobei in Betracht kommt, daß, wie oben gezeigt, den Werten der kolorimetrischen Methode immer eine Unsicherheit von einigen Prozenten anhaftet. Da das Prinzip beider Methoden ein völlig verschiedenes ist, ist die Übereinstimmung um so beweisender für die Richtigkeit der erhaltenen Werte.

Experimenteller Teil.

In Vorversuchen mit der kolorimetrischen Methode konnte ich mich bald überzeugen, daß acetessigsaures Natrium bei Digestion mit Rinderleberinfus in nicht unbeträchtlichem Maße zerstört wird.

Frische Rinderleber wird in der Fleischhackmaschine zerkleinert, darauf mit Quarzsand und dem vierfachen Volumen physiologischer (0,6 Proz.) Kochsalzlösung zerrieben, dann koliert. Von diesem Infus werden 150 ccm mit 150 ccm einer 5,6 proz.[1]) Lösung von acetessigsaurem Natrium gut durchgeschüttelt und unter Zusatz von Toluol in den Brutschrank gestellt (Probe A). Probe B: 150 ccm desselben Infuses, 1/4 Stunde lang über freier Flamme gekocht, nicht filtriert + 150 ccm derselben Lösung von acetessigsaurem Na. Nach 24 stündigem Aufenthalt im Brutschrank ergibt die kolorimetrische Bestimmung:

Von der sechsfach verdünnten Stammlösung (5,6 Proz.) von acetessigsaurem Na geben 0,5 ccm + 10,5 ccm Wasser + 1 ccm Eisenchloridlösung (10 Proz.) dieselbe Färbung wie von der dreifach verdünnten Probe A 1 ccm + 10 ccm Wasser + 1 ccm Eisenchloridlösung und von der dreifach verdünnten Probe B 1 ccm + 10 ccm Wasser + 1 ccm Eisenchloridlösung.

---

[1]) Der Prozentgehalt bezieht sich hier und im folgenden stets nur auf die Acetessigsäure.

In beiden Proben sind also 50 Proz. des zugesetzten acetessigsauren Salzes zerstört worden. Da der spontane Zerfall des acetessigsauren Natrons bei Bruttemperatur bedeutend langsamer vor sich geht — wie die weiter unten mitgeteilten Versuche beweisen —, ist diese Wirkung tatsächlich dem Leberinfus zuzuschreiben.

Merkwürdigerweise hatte ein $^{1}/_{4}$ stündiges Erhitzen des Infuses auf Siedetemperatur gar keinen Einfluß auf die Stärke der Wirkung. Schon dadurch mußte es unwahrscheinlich erscheinen, daß wir es hier mit einem Fermentprozeß zu tun haben. — Bei Weiterverfolgung des Spaltungsversuches ergab sich: Nach 48 Stunden Probe A 88 Proz., Probe B 80 Proz. der ursprünglich vorhandenen Menge zerstört. Nach weiteren 48 Stunden Brutschrankaufenthaltes zeigen beide Lösungen nur noch wenige Prozente des früheren Gehaltes an Acetessigsäure. (Bei so geringem Gehalt an Acetessigsäure läßt die Verläßlichkeit der kolorimetrischen Methode allerdings bedeutend nach.) Dagegen geben sie die Reaktion mit Nitroprussidnatrium anscheinend in unverminderter Intensität.

Da zu diesen Versuchen aus dem Schlachthause gelieferte, also ungenügend entblutete Organe verwendet worden waren, ging ich zunächst einmal daran, den Einfluß des Blutserums zu studieren. Bei diesen und den folgenden Bestimmungen bediente ich mich bereits der Methode der Kohlensäurebestimmung.

10 ccm einer 5,79 proz. Lösung acetessigsauren Natriums + 20 ccm Pferdeblutserum. Nach 22 Stunden Digestion im Brutschranke ergibt die Kohlensäurebestimmung:

4 Stunden durchlüftet. 125 ccm Barytwasser vorgelegt,

entsprechend	111,5 ccm	$^{1}/_{4}$ n-Barytwasser
zurücktitriert	72,8 ccm	$^{1}/_{4}$ HCl
	38,7 ccm	$^{1}/_{4}$ n-Barytwasser gebunden.

Hiervon sind folgende Abzüge zu machen: 1. Jede Lösung von acetessigsaurem Na enthält, wie schon oben angeführt, auch nach kurzer Aufbewahrung im Kühlraum eine kleine Menge Karbonat, die infolge Zerfalls von Acetessigsäure entstanden ist und natürlich auch bei der Berechnung des Gehaltes an acetessigsaurem Salze berücksichtigt werden muß. 2. Der Karbonatgehalt des Serums und zwar, um vollkommen gleichmäßige Bedingungen zu schaffen, nach 22 stündigem Aufenthalt im Brutschrank.

Wir haben dann

	38,7 ccm	$^{1}/_{4}$ n-Barytwasser
10 ccm der verwendeten Lösung von acetessigsauren Na binden	6,4 „	„
20 ccm Serum	4,6 „	„
	27,7 ccm	$^{1}/_{4}$ n-Barytwasser

entspricht 152,35 mg CO_2.

In Prozenten des früheren Gehaltes berechnet, heißt das: 61,2 Proz. des ursprünglich vorhandenen acetessigsauren Natriums wurden durch den Zusatz des Serums gespalten.

Die kolorimetrische Bestimmung des gleichen Versuches ergab eine Zerstörung von 61,6 Proz., also eine sehr gute Übereinstimmung.

Zum Vergleich sei jetzt ein Versuch angeführt, der über das bedeutend langsamere Tempo des spontanen Zerfalls acetessigsaurer Salze bei genau gleichen Versuchsbedingungen orientiert.

10 ccm einer 7,18 proz. Lösung von acetessigsaurem Natrium + 20 ccm destilliertes Wasser (Probe A). Während 22 Stunden Aufenthalt im Brutschrank werden 19,25 mg CO_2 abgespalten, entsprechend einer Zerstörung von 6,2 Proz. des vorhandenen acetessigsauren Natriums. Die kolorimetrische Bestimmung ergibt:

Von der 33 fach verdünnten Stammlösung acetessigsauren Na (7,18 Proz.) geben 0,5 ccm + 5 ccm Wasser + 1 ccm $FeCl_3$-Lösung dieselbe Färbung wie von der 11 fach verdünnten Probe A 0,54 ccm + 5 ccm Wasser + 1 ccm $FeCl_3$-Lösung.

Das entspricht einem Verluste von 7,4 Proz. Das Serum beschleunigt diesen Zerfall auf 61,2 Proz.

Die Übereinstimmung der Werte, die aus der Abnahme der Eisenchloridreaktion und aus der abgespaltenen Kohlensäuremenge berechnet wurden, zeigt, daß das Serum die Zerstörung der Acetessigsäure ausschließlich durch Absprengung der Karboxylgruppe vollzieht. Dann stand zu erwarten, daß die Summe von Aceton + Acetessigsäure, nach Messinger-Huppert bestimmt, im wesentlichen konstant bleibt. Darüber belehren folgende Versuche:

A. 2 ccm 7,84 proz. Lösung von acetessigsaurem Natrium + 4 ccm Serum
B. 2 „ 7,84 „ „ „ „ „ + 4 „ „
C. 4 „ Serum.

Nach 22 stündiger Digestion wird B mit C vereinigt und je 2 ccm von A und von (B + C) destilliert.

Destillat A bindet 33,9 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung = 32,8 mg Aceton [1]).
„ B „ 35,2 „ $^1/_{10}$ „ = 34 „ „ [1]).

Die Differenz beider Werte ist eine so geringe, daß die oben gestellte Forderung durch den Versuch erfüllt erscheint.

Auch im Serum ist das wirksame Agens kochbeständig, wie folgender Versuch zeigt:

A. 2 ccm acetessigsaures Natrium + 12 ccm Serum, dreifach verdünnt,
B. 2 „ „ „ + 12 „ „ „ „

[1]) Unter der Voraussetzung, daß alle jodbindende Substanz Aceton ist, was nicht ganz richtig ist, da die Lösung von acetessigsaurem Natrium auch Alkohol (aus dem Ester) enthält.

mehrere Minuten über freier Flamme gekocht. Bei dieser Verdünnung tritt keine Koagulation ein.

Nach 22stündigem Aufenthalt im Brutschrank:

In A zerstört 27,3 Proz. (kolorimetrisch bestimmt).
„ B „ 27,3 „ „ „

Gegen die Fermentnatur des wirksamen Körpers spricht außer der Hitzebeständigkeit auch noch folgende Reihe, die den Einfluß der Quantität des zugesetzten Serums auf die Spaltungsgröße demonstriert.

7,93 proz. Lösung von acetessigsaurem Na ccm	Serum ccm	Wasser ccm	Zerstört (kolorimetrisch bestimmt) Proz.
2	+ 0	+ 4	7,4
2	+ 0,1	+ 3,9	10,7
2	+ 0,5	+ 3,5	19,4
2	+ 1	+ 3	26,5
2	+ 2	+ 2	41,2
2	+ 4	+ 0	61,6

Die vorliegende Tabelle zeigt wohl keine stöchiometrische Gesetzmäßigkeit, läßt aber trotzdem die enzymatische Natur des Vorganges unwahrscheinlich erscheinen. Die geringe Wirkung, die der Zusatz von 0,1 ccm Serum entfaltet, wäre mit dieser Auffassung nur schlecht vereinbar.

Den zeitlichen Ablauf der Serumwirkung illustriert folgender Versuch:

2 ccm der 7,93 proz. Lösung acetessigsauren Na + 4 ccm Serum. Nach einer Digestion von 22 Stunden sind 61,6 Proz. zerstört, nach weiteren 48 Stunden 92,5 bis 93,5 Proz.; nach weiteren 24 Stunden ist der Wert kolorimetrisch nicht mehr exakt bestimmbar.

Nach dieser hochgradigen Wirksamkeit des Serums konnten auch die erstbeschriebenen Beobachtungen am Leberinfus auf den Blutgehalt des Organs bezogen werden. Ich nahm deshalb diese Versuche wieder mit sorgfältig entbluteten Organen auf.

Ein großes Kaninchen wird aus der Carotis möglichst vollständig entblutet, dann von der Vena femoralis aus mit Wasser solange durchgespült, bis aus der Carotis farblose Flüssigkeit abläuft. Die gut entbluteten Organe werden lebenswarm entnommen, in der Fleischhackmaschine zerkleinert, Leber und Niere mit dem gleichen, die Milz (4 g) mit dem fünffachen Volumen steriler physiologischer Kochsalzlösung verrieben und in den Brutschrank gestellt, nach dreitägiger Autolyse herausgenommen und filtriert.

Versuche. 20 ccm Infus von Kaninchenleber + 10 ccm 7,93 proz. acetessigsaures Na. Nach 22 stündiger Digestion:

Abgespalten . . 224,4 mg CO_2
Hiervon ab . . . 23,1 „ „ als bereits zu Beginn des Versuches in der Lösung des acetessigsauren Na enthalten
201,3 mg CO_2.

Daraus berechnet sich eine Zerstörung von 58,8 Proz. Die kolorimetrische Bestimmung ergibt 61,6 Proz.

Über den Mechanismus der Spaltwirkung gibt wieder die Bestimmung nach Messinger-Huppert Aufschluß.

A. 1 ccm acetessigsaures Na + 2 ccm Leberinfus }
B. 1 „ „ „ } kommen in den Brutschrank.
C. 2 „ Leberinfus }

Nach 22 stündiger Digestion wird B mit C vereinigt und die Bestimmung ausgeführt.

Destillat A bindet 49,6 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung, entsprechend 47,9 mg Aceton.
Destillat B + C „ 51,4 „ $^1/_{10}$ „ „ 49,7 „ „

Da die Summe Aceton + Acetessigsäure in diesem Versuche konstant blieb, kann die Zerstörung der Acetessigsäure nur über Aceton erfolgt sein.

Eine auffallend starke Wirkung hatte das Niereninfus. 5 ccm acetessigsaures Natrium 7,93 Proz. + 10 ccm Infus von Kaninchenniere. Nach 22 Stunden im Brutschrank:

CO_2 151,8 mg
Davon ab „ 11 „
140,8 mg CO_2,

das bedeutet eine Zerstörung von 82,3 Proz. der vorhandenen Acetessigsäure. Kolorimetrisch 82,8 Proz.

Die Wirkung des Milzinfuses war — wohl entsprechend der stärkeren Verdünnung desselben — eine schwächere. 5 ccm acetessigsaures Natrium + 10 ccm Milzinfus. Nach 22 Stunden:

CO_2 65,45 mg
Davon ab „ 11 „
54,45 mg,

das ergibt eine Zerstörung von 31,8 Proz. Kolorimetrisch 33,4 Proz.

Die Wirkung der gut entbluteten Organe ist zu kräftig, um durch den Blutgehalt derselben erklärt werden zu können, sie muß vielmehr als Eigenwirkung dieser Organe aufgefaßt werden.

Naturgemäß war es die nächste Aufgabe, die wirksame Substanz im Serum und Organen näher zu charakterisieren. Ich ging zu diesem Zwecke wieder vom Serum aus. Um zunächst die Wirkung eines anorganischen Körpers auszuschließen, stellte ich Versuche mit Serumasche an.

200 ccm Pferdeserum werden ohne Zusatz verascht, die Asche mit 200 ccm destilliertem Wasser ausgelaugt. Von dieser Lösung kommen 20 ccm mit 10 ccm acetessigsaurem Na (7,42 Proz.) auf 22 Stunden in den Brutschrank.

Gesamtmenge	CO_2 89,1 mg
Davon ab in der Lösung von acetessigsaurem Na enthalten	„ 46,2 „
In der Serumasche	„ 24,75 „
	18,15 mg CO_2

entsprechend einer Zerstörung von 5,9 Proz. Kolorimetrisch 7,4 Proz., also ungefähr ebensoviel, als bei Zusatz von destilliertem Wasser.

Nun untersuchte ich, ob die wirksame Substanz dialysabel sei.

10 ccm acetessigsaures Na (7,42 Proz.) + 20 ccm Serum, das durch 11 Tage gegen fließendes Wasser dialysiert worden war.

Nach 22 Stunden: Gesamtmenge CO_2	192,5 mg
Davon ab „	46,2 „
	146,3 mg CO_2,

entspricht einer Zerstörung von 45,7 Proz. der vorhandenen Acetessigsäure. Kolorimetrisch 46,7 Proz.

Die Wirkung des dialysierten Serums erreicht demnach nicht ganz die des nativen (61,2 Proz.), ist aber noch immer sehr beträchtlich. Die Hauptmenge der wirksamen Substanz ist jedenfalls auch bei 11 tägiger Dialyse gegen fließendes Wasser nicht verloren gegangen. Andererseits ist zu bedenken, daß echte Eiweißköper, mehr noch albumosenartige Substanzen, ebenfalls etwas dialysabel sind.

Da es sich nach den bisherigen Versuchen um organische, nicht oder nur schlecht dialysable Substanzen von nicht fermentartiger Wirkung handeln mußte, lag es nahe, die Wirksamkeit isolierter Eiweißkörper zu untersuchen.

Die Globulinfraktion des Pferdeblutserums wird durch Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat abgeschieden und durch Umfällen gereinigt. 20 ccm einer Lösung dieser Fraktion (die in 100 ccm 0,45 g N enthält) + 10 ccm der 7,42 proz. Lösung von acetessigsaurem Natrium.

Nach 22stündiger Digestion: Gesamtmenge CO_2	108,9 mg
Davon ab „	46,2 „
	62,7 mg CO_2,

entsprechend einer Zerstörung von 19,6 Proz. der vorhandenen Acetessigsäure. Kolorimetrisch 21,2 Proz.

Das isolierte Serumglobulin übt also eine deutliche, wenn auch nicht sehr beträchtliche Spaltwirkung aus. Daß das in der Lösung noch vorhandene Magnesiumsulfat keinerlei Einfluß hat, wurde vorher in besonderen Versuchen festgestellt.

Das Filtrat, nach Ganzsättigung mit Magnesiumsulfat, wurde einer 24stündigen Dialyse gegen fließendes Wasser unterworfen und sodann in gleicher Weise geprüft.

Nach 22stündigem Aufenthalt im Brutschrank waren 37,5 Proz. der vorhandenen Acetessigsäure zerstört (kolorimetrisch bestimmt). Da dieses dialysierte Filtrat im wesentlichen eine Lösung von Serumalbumin darstellt, mußte dieser Eiweißkörper mit der Spaltwirkung etwas zu tun haben. In der Tat zeigten Versuche mit kristallisiertem Serumalbumin die Wirksamkeit auch des reinen Eiweißkörpers.

10 ccm einer 7,18 proz. Lösung von acetessigsaurem Natrium + 20 ccm einer Lösung von kristallisiertem Serumalbumin (N-Gehalt der Lösung 0,252 Proz.), das nach der üblichen Methode dargestellt und einmal umkristallisiert war.

Nach 22 Stunden Digestion:	Gesamtmenge CO_2	165,0 mg
	Davon ab „	25,3 „
		139,7 mg CO_2,

entsprechend einer Zerstörung von 45 Proz. des vorhandenen Salzes. Kolorimetrisch 45 Proz.

Entfernt man aus dem Serum die Globuline mittels Magnesiumsulfat und das Albumin durch schwaches Ansäuern, so entfaltet das Filtrat nur mehr eine sehr schwache Wirkung (11,8 Proz. Zerstörung bei analogen Versuchsbedingungen). Ebenso schwindet die wirksame Substanz zum allergrößten Teile, wenn man das Serum bei schwach essigsaurer Reaktion koaguliert.

4 ccm des Filtrates + 2 ccm 7,42 proz. Lösung von Acetessigsäure weisen nach 22 Stunden eine Spaltung von 13,8 Proz. auf, während, wie schon berichtet, durch Kochen bei nativer Reaktion, wenn die Eiweißkörper am Ausfallen verhindert sind, die Wirkung nicht beeinträchtigt wird.

Ähnlich wie die Eiweißkörper des Blutserums haben auch andere Proteïne die Fähigkeit, den spontanen Zerfall der acetessigsauren Salze zu beschleunigen. Ich habe in dieser Richtung noch folgende Versuche angestellt.

Caseïn. Zur Verwendung kam Mercksches Caseïn (Hammarsten) in schwach alkalischer Lösung, deren Stickstoffgehalt 1,12 Proz. betrug.

10 ccm Lösung von acetessigsaurem Natrium (7,93 Proz.) + 20 ccm Caseïnlösung. Während der 22stündigen Digestion im Brutschrank wurden 227,7 mg Kohlensäure aus der Acetessigsäure abgespalten, d. h. es wurden 66,5 Proz. zerstört. Die Summe Aceton + Acetessigsäure blieb auch in diesem Versuche unverändert.

A. 1 ccm acetessigsaures Na + 2 ccm Caseïnlösung.
B. 1 „ „ „
C. 2 „ Caseïnlösung.

Nach 22 stündiger Digestion werden B und C vereinigt und destilliert.
Das Destillat von A bindet 51,6 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung = 49,9 mg Aceton.
„ „ „ B + C „ 51,1 „ $^1/_{10}$ „ = 49,4 „ „

Edestin. Das Präparat wurde dem Institute von den Höchster Farbwerken in liebenswürdiger Weise übermittelt. Es wurde einmal umkristallisiert (gut ausgebildete Kristalle) und in 10 proz. Kochsalzlösung gelöst. N-Gehalt der Lösung: 1,5 Proz.

10 ccm einer 7,84 proz. Lösung von acetessigsaurem Na + 20 ccm der Edestinlösung.

Nach 22 Stunden: Gesamtmenge	CO_2	112,78 mg
Davon ab	„	21,45 „
		91,28 mg CO_2,

entsprechend einer Zerstörung von 26,9 Proz.

Ich weiß wohl, daß auch die Kristallisation eines Eiweißkörpers es nicht ausschließt, daß er Fermente adsorbiert enthält, auf welche die beobachtete Wirkung zurückgeführt werden könnte. In unserem Falle aber, wo oben angeführte Gründe entschieden gegen fermentative Prozesse sprechen, können wir mit gutem Rechte das Proteïn selbst für die Spaltung der Acetessigsäure verantwortlich machen. Auch die Eiweißkörper des Eieralbumins zeigen den gleichen Einfluß.

10 ccm einer 7,42 proz. Lösung von acetessigsaurem Na + 20 ccm einer schwach alkalischen Lösung von getrocknetem Eiklar. Es werden in 22 stündiger Digestion 38,5 Proz. Acetessigsäure zerstört (123,2 mg CO_2).

Weitere Untersuchungen beziehen sich auf Spaltprodukte der Eiweißkörper. Zunächst verwendete ich das Albumosenpeptongemenge des käuflichen Wittepeptons.

10 ccm einer 5,79 proz. Lösung acetessigsauren Na + 10 ccm einer 10 proz. Lösung von Wittepepton.

Nach 22 stündiger Digestion: Gesamtmenge . . .	CO_2	161,15 mg
Davon ab: In der Peptonlösung allein (nach 22 Stunden Digestion) enthalten	„	7,15 „
In der Acetessigsäure-Lösung von vornherein	„	38,5 „
Während des Versuches abgespalten	„	115,5 mg,

das bedeutet eine Zerstörung von 47 Proz.

Die Bestimmungen nach Huppert-Messinger ergaben wieder die Konstanz der Summe Aceton + Acetessigsäure. Bei der weiteren Zerlegung des Wittepeptons in die bekannten Bestandteile mußte ich aus später zu erörternden Gründen die fraktionierte

Ammonsulfatfällung umgehen. Ich isolierte zunächst die Heteroalbumose, indem ich mittels Halbsättigung mit Zinksulfat in saurer Lösung die Proto- und Heteroalbumosenfraktion abschied und die Lösung dieser Fraktion nach dem Vorgange von E. P. Pick auf einen Alkoholgehalt von 33 Proz. brachte. Die hierdurch ausgefällte Heteroalbumose wurde mit verdünntem Alkohol sorgfältig gewaschen. Die Lösung dieser Albumose in schwachem Alkali enthält kein Zinksalz mehr. Übrigens ist auch eine gesättigte Lösung von Zinksulfat ohne jeden Einfluß auf acetessigsaures Salz. N-Gehalt der Lösung 0,189 Proz.

10 ccm einer 7,93 proz. Lösung acetessigsauren Na + 20 ccm Heteroalbumosenlösung.

Nach 22 Stunden sind 85,8 mg CO_2 abgespalten (108,9 — 23,1 mg CO_2), das entspricht einer Zerstörung von 25 Proz.

Deuteroalbumose. Sie wurde nach Abscheidung der Proto- und Heteroalbumose durch Ganzsättigung mit Zinksulfat in saurer Lösung gefällt, einmal umgefällt. N-Gehalt der schwach alkalischen Lösung 0,308 Proz.

5 ccm 7,93 proz. Lösung acetessigsaures Na + 10 ccm Deuteroalbumose.

Nach 22 Stunden sind 97,9 mg CO_2 (121 — 23,1 mg) abgespalten, d. h. 61,2 Proz. zerstört. Kolorimetrische Bestimmung 61,6 Proz.

Das Filtrat der Peptonlösung nach Ganzsättigung mit Zinksulfat enthält noch wirksame Substanz. Hier müssen tiefer stehende Eiweißspaltungsprodukte in Betracht kommen, wofür auch folgende Versuche sprechen.

Eine 10 proz. Lösung von Wittepepton wird durch 3 Wochen mit Trypsin verdaut. Die Flüssigkeit gibt bei Sättigung mit Ammonsulfat nur mehr eine schwache Trübung, dagegen noch deutliche Biuretreaktion.

2 ccm dieser Lösung + 2 ccm acetessigsaures Na (5,79 Proz.). Nach 22 Stunden sind 79,6 Proz. zerstört. (Kolorimetrisch.)

Auch die Produkte der Säure- und Alkalispaltung des Peptons Witte wurden in den Bereich der Untersuchung gezogen.

10 g Pepton werden mit 4 ccm konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,19) eine halbe Stunde am Rückflußkühler gekocht, dann genau neutralisiert und mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Die Lösung gibt keine Biuretreaktion mehr. 10 ccm dieser Lösung + 10 ccm acetessigsaures Natrium von 7,93 Proz.

Nach 22 stündiger Digestion sind 267,3 mg CO_2 (290,4 — 23,1 mg) abgespalten, das bedeutet eine Zerstörung von 78,1 Proz.

Ferner werden 10 g Pepton in 100 ccm einer 5 proz. Natronlauge mehrere Stunden am Rückflußkühler gekocht, dann bis zu schwach alkalischer Reaktion neutralisiert und auf 120 ccm aufgefüllt. (Biuretreaktion positiv.)

20 ccm dieser Lösung + 10 ccm acetessigsaures Natrium 7,93 Proz.

Nach 22 Stunden sind 273,9 mg CO_2 abgespalten = eine Zerstörung von 80 Proz.

Da bei gleich langer Digestion aus einer Mischung von acetessigsaurem Natrium und 10 proz. Peptonlösung im Verhältnis 1:1, wie oben gezeigt, nur 47 Proz. verschwinden, aus der Mischung 1 acetessigsaures Natrium zu 2 Peptonlösung auch nur 62,5 Proz., so ist es klar, daß die biuretfreien Endprodukte der Eiweißspaltung einen noch stärkeren Einfluß auf den Zerfall der Acetessigsäure haben als die Eiweißkörper selbst. Versuche mit einzelnen Aminosäuren gaben dementsprechend auch positive Resultate.

2 ccm 7,18 proz. acetessigsaures Na + 4 ccm einer Lösung von Leucin in schwachem Alkali.

Nach 22 Stunden: 75 Proz. zerstört. (Kolorimetrisch.)

2 ccm 7,18 proz. acetessigsaures Na + 4 ccm Alanin in schwach alkalischer Lösung. Nach 22 Stunden: etwa 90 Proz.[1]) zerstört.

2 ccm 7,18 proz. acetessigsaures Na + 4 ccm Asparaginsäure in schwach alkalischer Lösung. Nach 22 Stunden: etwa 77 Proz.[1]) zerstört.

2 ccm 7,84 proz. acetessigsaures Na + 4 ccm Tyrosin in schwach alkalischer Lösung. Nach 22 Stunden: etwa 24,3 Proz. zerstört.

Neben den Aminosäuren kommen aber unter den Produkten der Säurespaltung und der Trypsinverdauung auch noch die Ammonsalze für die zerstörende Wirkung in Betracht. Unter zahlreichen Versuchen mit anorganischen Körpern der verschiedensten Art (ich führe hier an: $MgSO_4$, $ZnSO_4$, NaCl, Na_2HPO_4, $FeCl_3$, $BaCl_2$ usw. auch in stärkster Konzentration[2]) zeigte kein einziger einen Einfluß auf die Geschwindigkeit des spontanen Zerfalles der Acetessigsäure, mit Ausnahme der Ammonsalze; diese hatten aber eine sehr deutliche Wirkung.

10 ccm 5,79 proz. acetessigsaures Na + 10 ccm einer 10 proz. Lösung von NH_4Cl. (Die Probe ist schwach alkalisch.)

Nach 22 Stunden sind 159,5 mg CO_2 (194,7 — 35,2 mg) abgespalten, d. h. 64,1 Proz. acetessigsaures Na zerstört. Kolorimetrisch 64,3 Proz.

Der Modus der Zerstörung ist derselbe, wie bei der Einwirkung der Eiweißkörper, da der Betrag an destillabler jodbindender Substanz sich nur unbedeutend ändert.

---

[1]) Wegen des geringen Gehaltes an Acetessigsäure fällt die kolorimetrische Bestimmung unscharf aus.

[2]) Ebenso ist der Zerfall innerhalb gewisser Grenzen vom Grade der Alkalinität unabhängig. Eine zu Beginn des Versuches genau neutrale Probe und eine solche, deren Alkaligehalt einer $^2/_3$ Normallauge entspricht, geben die gleichen Resultate.

A. 1 ccm 8,42 proz. acetessigsaures Natrium + 1 ccm NH_4Cl (10 Proz.).
B. 1 „ 8,42 „ „ „
C. 1 „ NH_4Cl 10 Proz.

Nach 22stündiger Digestion wird B mit C vereinigt.

Destillat A bindet 45,6 ccm $^1/_{10}$ n-Jodlösung = 44,5 mg Aceton.
Destillat B + C „ 49,6 „ $^1/_{10}$ „ = 48,4 „ „

Während so die Ammonsalze in schwach alkalischer Lösung eine sehr deutliche Wirkung entfalten, ist der Effekt von freiem Ammoniak ein viel schwächerer.

10 ccm 7,91 proz. acetessigsaures Natrium + 10 ccm Ammonia pura liquid. (spez. Gew. 0,888) + 10 ccm Aqua destillata.

Nach 22 Stunden: Gesamtmenge	CO_2	101,75 mg
Davon ab: Im acetessigsauren Na von vornherein enthalten	„	22 „
Im Ammoniak „ „ „	„	31,9 „
		47,85 mg CO_2,

entsprechend einer Zerstörung von 14 Proz. (Kolorimetrisch 14,9 Proz.)

Zusatz von geringen Mengen Ammonsalz verstärkt jedoch die Wirkung freien Ammoniaks bedeutend.

2 ccm 7,18 proz. acetessigsaures Natrium + 2 ccm Ammoniak + 0,1 ccm NH_4Cl (10 Proz.) + 1,9 ccm Aqua destillata.

Nach 22 Stunden sind 37,5 Proz. zerstört. (Kolorimetrisch bestimmt.)

Ob die früher gezeigte Wirkung der Ammonsalze ebenfalls dem in der alkalischen Lösung freigewordenen Ammoniak zuzuschreiben ist, wobei die Ammonsalze, wie im letzten Versuch, nur unterstützend wirken würden, oder ob das durch Umsetzung entstandene acetessigsaure Ammon zersetzlicher ist als acetessigsaures Natrium, muß noch durch besondere Versuche entschieden werden.

Eine ähnlich ausgiebige Zerstörung der Acetessigsäure ruft auch der Zusatz gewisser Amide hervor: Formamid, Asparagin. Eine 10 proz. Lösung von Harnstoff hatte hingegen fast gar keine Wirkung.

Übersicht.

Der experimentelle Teil lehrt, noch einmal kurz zusammengefaßt, folgendes: Bei Digestion von acetessigsaurem Natrium mit Blutserum oder Organauszügen erfolgt ein beschleunigter Zerfall des Salzes unter Abspaltung von Kohlensäure und Bildung von Aceton. Die weitere Forschung nach der Natur der wirksamen Substanz im Serum ließ dieselbe als einen organischen, nicht dialysablen Körper erkennen, der hitzebeständig ist und nicht ferment-

artig wirkt. Die Vermutung, daß im Serum die Eiweißkörper das wirksame Agens darstellen, bestätigte sich. Durch Umfällen gereinigtes Globulin, sowie kristallisiertes Serumalbumin zeigen deutlich eine spaltende Wirkung. Andere gereinigte Eiweißkörper, wie Caseïn (Hammarsten) und kristallisiertes Edestin haben den gleichen Einfluß. Dieselbe Wirkung zeigen ferner das Wittepepton, sowie durch fraktionierte Salzfällung aus demselben isolierte Hetero- und Deuteroalbumose. Aber auch abiurete Spaltungsprodukte des Eiweißes sind wirksam, ebenso schließlich reine Aminosäuren wie Leucin, Alanin usw., ferner gewisse Amide. Von anorganischen Substanzen kommen nur die Ammonsalze in Betracht.

Diese Tatsachen erfordern nach zwei Seiten hin eine weitere Besprechung: Die Natur des Spaltungsvorganges, sowie seine Bedeutung für physiologisches und pathologisches Geschehen bedürfen der Erörterung. — Es fällt sofort auf, daß allen von mir als wirksam befundenen Substanzen eines gemeinsam ist: das Vorhandensein von NH_2-Gruppen. Über die Einwirkung solcher Gruppen auf Acetessigester liegt in der chemischen Literatur bereits eine Reihe von Angaben vor. Duisberg[1]) erhielt bei Behandlung von Acetessigester mit wässerigem Ammoniak eine als Paraamidoacetessigester bezeichnete kristallinische Substanz, die durch Behandlung mit überschüssiger Salzsäure, aber auch durch verdünnte Natronlauge bei mäßiger Wärme in Kohlensäure, Aceton und Alkohol zerfiel. Nach Collie[2]) ist der Paraamidoacetessigester entweder β-Amidocrotonsäureester oder β-Imidobuttersäureester. Conrad und Epstein[3]), die den Gegenstand später wieder bearbeitet haben, sprechen sich für die erste Formel aus. Danach würde also der Ester in der Enolform die besprochene Reaktion eingehen. Nach den letztgenannten Autoren gelingt die Amidierung des Acetessigesters am besten, wenn man Ammoniakgas in den abgekühlten und mit etwa dem doppelten Volumen Äther versetzten Ester einleitet. Sehr vorteilhaft ist dabei die Suspension von Ammoniumnitrat in der Mischung. Man läßt zwei Tage im verschlossenen Gefäß stehen.

Analoge Verbindungen entstehen nach Kuckert[4]) durch Einleiten von Methylamin:

---

[1]) Liebigs Ann. d. Chem. u. Pharm. 213, 134.
[2]) Ebenda 226, 294.
[3]) Berichte d. deutsch. chem. Ges. 20, 3052.
[4]) Ebenda 18, 618.

$$\begin{array}{lcl} CH_3 & & CH_3 \\ | & & | \\ C{-}NHCH_3 & & C = NCH_3 \\ \| & \text{oder} & | \\ CH & & CH_2 \\ | & & | \\ COOC_2H_5 & & COOC_2H_5 \end{array}$$

Alle diese Versuche sind mit Acetessigester angestellt; es ist aber unwahrscheinlich, daß sich acetessigsaure Salze in dieser Hinsicht prinzipiell anders verhalten sollten. Da die erwähnten Aminocrotonsäuren unter Bedingungen sich bilden, ähnlich denen, die in meinen Digestionsversuchen bestanden, so erscheint mir die Hypothese nicht unberechtigt, daß auch in meinen Versuchen intermediär ähnliche Verbindungen entstehen, die dann leicht in Kohlensäure, Aceton und einen Rest zerfallen. Dies könnte nicht nur für Ammonsalze und Aminosäuren Geltung haben, auch für die Eiweißkörper ist es ganz gut denkbar, daß sie analog der Bildung von Aldehydeiweiß mit der Ketongruppe der Acetessigsäure durch Vermittelung von Aminogruppen reagieren. Jedenfalls ist diese Auffassung einer experimentellen Prüfung zugänglich, die demnächst in Angriff genommen werden soll.

Die Frage nach der Übertragbarkeit der Vorgänge in überlebenden Organen auf die Lehre vom physiologischen Stoffwechsel ist noch immer eine strittige. Glücklicherweise berechtigt uns der Ausfall unserer Versuche, derselben aus dem Wege zu gehen. Es hat sich unzweifelhaft gezeigt, daß es sich bei der Zerstörung der acetessigsauren Salze durch Organextrakte, Serum usw. nicht um vitale, fermentative Prozesse, sondern um einfache chemische Reaktionen handelt. Solche müssen aber im lebenden Organismus gerade so vor sich gehen wie in vitro, oder es müssen besondere physiologische Einrichtungen getroffen sein, um den Prozeß anders zu leiten. In beiden Fällen ist die Kenntnis dieser Reaktionen unerläßliche Bedingung für das Verständnis des Abbaues der Acetonkörper im tierischen Organismus.

Der rasche Zerfall zu Aceton und Kohlensäure, den acetessigsaures Natrium unter Bedingungen erleidet, die denen im lebenden Organismus analog sind, läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß der physiologische Abbau der Acetessigsäure nicht über Aceton geht. Dennoch ist diese Auffassung von Schwarz und Geelmuyden für den nichtdiabetischen Organismus vertreten worden, um den Widerspruch zu erklären, der zwischen der leichten Verbrennlich-

keit der Acetessigsäure und der schweren Angreifbarkeit des Acetons im Körper des normalen Tieres besteht. Auch in dieser Frage hoffe ich durch Tierversuche, die bereits in Angriff genommen wurden, weiter zu kommen. Ferner soll der Einfluß untersucht werden, welchen die bei diabetischer und anderer Acidosis bestehende Anreicherung des Organismus an Ammonsalzen auf das Tempo des Zerfalles der Acetessigsäure ausübt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Privatdozent Dr. E. P. Pick für liebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank abzustatten.

Wien, den 27. April 1907.

Kürzere Mitteilungen.

4. Über die Färbung des Harns bei Lysolvergiftung.

Von Dr. **O. Matter,** Ober-Apotheker am Bürgerspital.

In Liebreichs Enzyklopädie der Therapie, Berlin 1898, finden wir unter Lysol folgende Angaben: „Lysol wird erhalten durch Kochen eines Gemenges von Teerölen — Fett und Harz mit einer entsprechenden Menge Alkali . . . . . Der Urin ist (nach Lysolvergiftung) nicht dunkel gefärbt wie nach Karbolsäure, enthält aber Eiweiß."

Da letztere Angabe leicht zu einer Schlußfolgerung auf die Natur des genommenen Giftes führen könnte, will ich an der Hand eines Falles nachweisen, daß das Kriterium „Der Urin ist nicht dunkel gefärbt wie nach Karbolsäure" nicht immer Gültigkeit haben kann.

Am 10. März 1907 hatte eine 19jährige Näherin aus einer Flasche zu 100 g ungefähr 30 g [1]) Lysol getrunken. Sie war gleich nach dem Lysolgenuß ohnmächtig hingefallen und von dem sofort herbeigerufenen Arzte noch in diesem Zustande gefunden worden. Eine Magenausspülung förderte zahlreiche Speisereste und stark nach Lysol riechende Flüssigkeit zutage; es wurde so lange gespült, bis das Spülwasser klar wurde. Patientin wachte gleich darauf aus der Ohnmacht auf und wurde nach dem Bürgerspital transportiert.

Status: Patientin vollständig bei Bewußtsein. Am Mundeingang rechts einige Hautverbrennungen von Lysol. Am rechten Gaumenbogen eine leicht blutende Stelle. Die Atemluft riecht nach Lysol. Sofort nach der Einlieferung wurde eine Magenausspülung mit 5 Liter Wasser gemacht. Das Spülwasser riecht noch und fördert zahlreiche Speisereste zutage.

Der Urin ist zuerst dunkelgelb und dunkelt an der Luft stark nach, so daß er fast tiefschwarz wird.

Da letzterer Befund nach Langgaard auf Karbolsäure- und nicht auf Lysolvergiftung schließen ließ, erbat ich mir von dem dirigierenden Arzt der Abteilung, Herrn Prof. Dr. Cahn, eine Probe der von der Patientin genommenen Flüssigkeit. Die Untersuchung ergab, daß

---

[1]) Wenn im folgenden von Lysol die Rede ist, so ist damit nicht ausschließlich das von der Firma Schülke & Mayr in den Handel gebrachte Präparat gemeint, sondern die Kresolseifenlösungen im allgemeinen, die verschiedenen Kresolseifenmischungen „inkonstanter Zusammensetzung" und die aus Trikresol dargestellten Präparate.

zweifellos Kresolseifenlösung vorlag (bestehend aus etwa 50 Proz. Kresolen und etwa 50 Proz. Schmierseife).

Der mir ebenfalls von Herrn Prof. Dr. Cahn freundlichst überlassene Harn war fast schwarz mit einem Stich ins Graugrüne. Mit Bromwasser entstand eine deutliche Fällung.

Die Dunkelfärbung des Harns nach Einnahme von Phenol ist auf eine Oxydation desselben im Tierkörper zu Hydrochinon zurückzuführen.

Da es nicht gelang, nach der Methode von Baumann und Preusse Hydrochinon durch Ausschütteln mit Äther zu isolieren, war die Annahme, daß die Patientin Phenol eingenommen hatte, auszuschließen.

Die Schwarzfärbung des Harns war somit dem Lysol zuzuschreiben und es lag die Wahrscheinlichkeit nahe, daß im Lysol Körper vorhanden sind, die ebenso wie das Phenol ihre Schwarzfärbung des Harns bewirken.

Aus Schmiedebergs Angaben (Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. 8, 11) geht hervor, daß die Dunkelfärbung des Harns auch nach Eingabe anderer aromatischer Substanzen erfolgt, z. B. Brenzcatechin und Anilin.

Das Lysol ist nun eine unter Anwendung von Wärme bewirkte Auflösung von 1 Teil Steinkohlenteerkresol vom Siedepunkt 182 bis 210° in 1 Teil neutraler Leinölkaliseife.

Ist zur Lysoldarstellung ein Kresolgemisch vom Siedepunkt 182 bis 210° verwandt worden, so ist, da der Siedepunkt des Phenols bei 182° liegt, gar nicht ausgeschlossen, daß von vornherein Phenol in diesem Kresolgemisch enthalten ist und somit auch in das Lysol übergeht.

Angenommen jedoch, daß nur reines Trikresol, wie es unter anderem von Schering dargestellt wird, mit etwa 35 Proz. Ortho-, etwa 40 Proz. Meta- und etwa 25 Proz. Parakresol zur Kresolseifenlösung verwendet worden ist, so ist auch hier eine Dunkelfärbung des Harns zu erwarten. Denn nach Baumann (Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 81) geht Parakresol im Tierkörper in Paraoxybenzoësäure, Orthokresol in Hydrotoluchinon über, während Metakresol unverändert als Ätherschwefelsäure ausgeschieden wird. Das im Trikresol befindliche Orthokresol bzw. sein Umwandlungsprodukt, das Hydrotoluchinon, bewirkt auch hier eine Schwarzfärbung des Harns.

Letztere würde nur ausbleiben, wenn ein Lysol vorliegt, das frei von Orthokresol ist, eine Bildung von Hydrotoluchinon somit ausgeschlossen ist. Es ist nun festgestellt worden, daß im Handel Kresolseifenlösungen vorkommen, die orthokresolfrei sind. Eine Schwarzfärbung des Harns ist bei diesen also nicht zu erwarten.

Bei den anderen Lysolen, die entweder aus reinem Trikresol oder aus Steinkohlenteerkresol dargestellt sind, wird ebenso eine Schwarzfärbung eintreten wie nach Karbol.

Ein Schluß, ob Karbol- oder Lysolvergiftung vorliegt, läßt sich somit aus der Dunkelfärbung des Harns nicht ziehen.

Straßburg, 3. Juni 1907.

XII.

Über das Haarpigment nebst Versuchen über das Chorioidealpigment.

Von **Eduard Spiegler.**

Zweite Mitteilung[1]).

Aus dem Spieglerschen Laboratorium in Wien.

Die Schwierigkeit dieser Untersuchungen einerseits, die technische Umständlichkeit andererseits, das Ausgangsmaterial in den notwendigen Mengen zu beschaffen, sind die Ursachen, daß über die angekündigte Fortsetzung dieser Untersuchungen erst heute wieder berichtet werden kann.

Indem ich hinsichtlich der Details der in der ersten Arbeit mitgeteilten Tatsachen auf diese selbst verweise, will ich hier nur die wesentlichsten Resultate der ersten Mitteilung kurz in Erinnerung rufen:

Das Pigment aus Roßhaaren oder Schafwolle kann durch geeignete Methoden in größeren Mengen dargestellt werden. Das so dargestellte Pigment ist eine Farbsäure. Die Haare der Schimmel und der weißen Schafe enthalten ein weißliches Pigment und ihre Farbe beruht daher nicht, wie man bisher angenommen hatte, auf Pigmentmangel. Das schwarze und das weißliche Pigment stehen einander in ihrer Zusammensetzung außerordentlich nahe, und das weiße läßt sich leicht in einen schwarzen Körper umwandeln. Sowohl das Pigment aus schwarzen Roßhaaren als auch das aus Schimmelhaaren gibt bei der Oxydation mit Chromsäure einen identischen Körper, nämlich Methyldibutylessigsäure. Aber nicht nur dieses Verhalten spricht für die nahe Verwandtschaft dieser beiden Pigmente,

---

[1]) Erste Mitteilung: Diese Beiträge 4, 40 (1904).

sondern, wie ich gezeigt habe, auch ihre sehr ähnliche Zusammensetzung. Aber auch eine kurze Überlegung macht es verständlich, daß das weiße Schimmelhaar nicht pigmentlos sein kann. Wir kennen pigmentlose Haare, nämlich die der Albinos. Diese sind aber keineswegs weiß, sondern sie haben angesichts des mangelnden Pigmentes die Farbe des Hornrohstoffes, aus dem das Haar besteht, modifiziert durch die besonderen morphologischen Verhältnisse.

Waldeyer[1]) nimmt zwar nicht völligen Pigmentmangel an, „da man meistens einen geringen gelblichen Schimmer des Haares, namentlich, wenn eine Partie Haare zusammenliegt, bemerkt“.

Dies wäre indes, wie bemerkt, auch durch den pigmentlosen Hornstoff des Haares erklärlich. Immerhin bedürfte diese Frage noch einer exakteren Untersuchung. Man müßte nämlich untersuchen, ob auch aus albinotischem Haare sich die gleichen Oxydationsprodukte darstellen lassen wie aus gefärbten. Auf demselben Wege wäre endlich die Frage zu entscheiden, ob die weiße Farbe des Greisenhaares nicht, wie man bisher annahm, dem Pigmentschwund und Luftgehalt, sondern vielmehr der Umwandlung des dunkleren Pigmentes in helles zuzuschreiben ist.

Während die Lösung der Frage über den etwaigen geringen Pigmentgehalt der Haare von Albinos an der Schwierigkeit, sich genügende Mengen dieses Materials zu verschaffen, scheitern dürfte, beabsichtige ich, der Frage über die Ursache der weißen Farbe des Greisenhaares noch näher zu treten.

Was nun die Methyldibutylessigsäure selbst betrifft, so ist diese eine Penta-Methylpentankarbonsäure und entspricht dem Kohlenwasserstoffe Duodekylen, welcher acht Methylgruppen enthält.

Es liegt nun allerdings noch die Frage vor, ob und inwieweit die melanotischen Pigmente aus Tumoren mit dem Pigment der Haare in Beziehung stehen. Die bisher vorliegenden Arbeiten über melanotisches Pigment haben hierüber keinen Aufschluß gebracht, weil sich dieselben nach anderer Richtung bewegt haben. Erst Hans Wolff[2]) ist dieser Frage näher getreten, indem er das Pigment aus melanotischen Lebern der oxydativen Spaltung mit Brom und Bromwasserstoffsäure unterzog. Der Körper, den Wolff erhielt, steht dem meinigen sehr nahe. Wolff faßt ihn als Xyliton auf, dem eine der folgenden Formeln zukommt:

---

[1]) Waldeyer, Atlas der menschlichen und tierischen Haare.

[2]) Hans Wolff, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente. Diese Beiträge 5, 476.

$$CH_3.C\begin{array}{l}\diagup CH\text{————————}C(CH_3)_2 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\quad >CH_2 \\ \diagdown C[:C(CH_3)_2].CO\end{array}$$

oder

$$CH_3.C\begin{array}{l}\diagup CH\ .\ C(CH_3)_2 \\ \qquad\qquad\quad >C:C(CH_3)_2. \\ \diagdown CH_2.CO\end{array}$$

Bekanntlich entsteht Xyliton bei der Einwirkung von Säuren oder Alkalien auf Aceton neben Mesityloxyd $(CH_3)_2.C:CH.CO.CH_3$ und Phoron $(CH_3)_2.C:CH.CO.CH:C(CH_3)_2$. Vergleicht man mit diesen Formeln die des Kohlenwasserstoffs, welcher der von mir gefundenen Methyldibutylessigsäure zugrunde liegt, dem die Formel

$$\begin{array}{l}(CH_3)_3\text{—}C \\ (CH_3)_3\text{—}C\end{array}>C = (CH_3)_2$$

zukommt, so fällt, wie auch Wolff hervorhebt, der große Reichtum an Methylgruppen in diesen beiden Körpern auf. Dieser Umstand deutet mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Abstammung aus einem gemeinsamen Kern hin. Da aber unsere Methodik eine ganz verschiedene war, so liegt wohl die Möglichkeit vor, daß die Spaltung des Kernes nach einer anderen Richtung hin erfolgt ist und trotzdem einander sehr nahe stehende Körper aus derselben Grundsubstanz entstanden sind. Die Entscheidung hierüber wird aber dann erst möglich sein, wenn man auch aus anderen Melaninen ebensolche an Methylgruppen reiche Verbindungen erhalten haben wird. Ich habe daher versucht, das Haarpigment analog, wie dies Wolff getan hat, mit Brom und Bromwasserstoffsäure zu zersetzen.

Versuch der Darstellung von Xyliton aus Haarpigment.

Schwarzes Haarpigment wurde aus Roßhaaren in der Weise dargestellt, daß diese durch neun Stunden mit rauchender Salzsäure gekocht wurden. Dasselbe wurde zuerst durch Dekantieren, schließlich durch Zentrifugieren säurefrei gewaschen und noch wiederholt mit absolutem Alkohol und Äther ausgekocht. Von diesem so gereinigten Pigment wurden je 2 g in 20 Röhren mit je 2 g konzentrierter Bromwasserstoffsäure und je $^1/_2$ g reinen Broms eingeschlossen und durch zwei Stunden auf 120° erhitzt. Der Röhreninhalt wird mit Wasser verdünnt, abfiltriert, der Niederschlag (anscheinend unverändertes Pigment) mit Äther ausgewaschen, das Filtrat hingegen mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird abgedunstet. Der Rückstand ist eine braun gefärbte sirupöse Masse. Diese wird mit Wasserdampf destilliert, wobei eine weiße kristallinische Substanz in Blättchen übergeht. Es wird so lange weiter destilliert, als noch etwas übergeht. Dies währt etwa drei Tage. Die Destillate werden in Äther aufgenommen, von diesem abgedunstet. Es hinterbleibt ein mit Kristallen gemengter Sirup. Seine Menge ist aber so gering, daß er nicht weiter untersucht werden kann.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die Reaktion, welche Wolff zum Xyliton führte, bei gleicher Behandlung des Haarpigmentes mit Brom und Bromwasserstoffsäure nicht eintritt. Es geht hieraus ferner hervor, daß das Pigment aus der melanotischen Leber von dem Haarpigment verschieden sein muß. Ich habe nun das mit Brom und Bromwasserstoffsäure behandelte Pigment, nachdem es sorgfältig gewaschen worden war, der Elementaranalyse unterworfen. Dieselbe ergab folgende Zahlen:

Aschebestimmung.

0,1175 g hinterließen nach dem Glühen 0,007 g Asche entsprechend einem Aschengehalt von 5,1 Proz.

C- und H-Bestimmung.

0,2048 g Substanz ergaben 0,414 g CO_2 und 0,566 g H_2O. Auf aschefreie Substanz gerechnet entspricht dies 58,06 Proz. C und 3,23 Proz. H.

N-Bestimmung.

0,1752 g Substanz ergaben 12,93 ccm N bei 25,9° C und 755 mm Barometerstand entsprechend 8,14 Proz. N, auf aschefreie Substanz gerechnet 8,57 Proz. N. Die Analyse entspricht der Formel $(C_8H_5O_3N)_n$.

	Berechnet für $(C_8H_5O_3N)_n$	Gefunden
C	. . . . 58,89 Proz.	58,06 Proz.
H	. . . . 3,00 „	3,23 „
N	. . . . 8,58 „	8,57 „
O	. . . . 29,44 „	— „

Von den in Betracht kommenden Körpern, welche dieser Zusammensetzung entsprechen, könnte es sich nur um die Isatosäure handeln, doch fiel die Reaktion mit thiophenhaltigem Benzol und konzentrierter Schwefelsäure negativ aus. Ob hier eventuell Polymerisation stattgefunden hat, vermag ich indes nicht zu entscheiden; jedenfalls gelangt man auf diese Weise zu einem Körper von wahrscheinlich relativ einfacher Zusammensetzung, doch ist die Substanz leider einer Molekulargewichtsbestimmung nicht zugänglich.

In gleicher Absicht versuchte ich eine Oxydation mit Chromsäure, diesmal in der Kälte:

40 g schwarzes Schafwollpigment werden mit Äther im Soxhletapparat bis zur Erschöpfung extrahiert. Der Äther färbt sich dabei tief braun, und es läßt sich aus der Lösung ein anscheinend amorpher, dunkelbrauner Körper fällen, der nicht weiter untersucht wurde. Das mit Äther extrahierte Pigment wurde unter stetem Wechsel mit Alkohol ausgekocht. Das so gereinigte Pigment wurde nun mit Chromsäure in einer Kältemischung oxydiert (100 g Bichromat, 220 g konzentrierte H_2SO_4, 440 g H_2O). Die Oxydation geht unter CO_2-Entwickelung vor sich. Um sie, wenn sie lebhafter wird, zu hemmen, werden kleine Eisstückchen eingetragen. Man überläßt nun das Gemenge im Eis-

schrank durch 24 Stunden sich selbst. Vom Oxydationsprodukt wird abfiltriert, der Niederschlag von der Chromsäure mit Wasser ausgewaschen, das Filtrat mit Äther ausgeschüttelt. Der Äther reagiert sauer. Auch das Filtrat wird abdestilliert. Es reagiert gleichfalls sauer.

Der Äther wurde, nachdem die Hauptmasse abdestilliert worden war, langsam abdunsten gelassen. Es kristallisierte dabei eine Substanz aus, jedoch in so geringen Mengen, daß sie nicht weiter untersucht werden konnte. Dasselbe gilt von einem geringen Niederschlage, der beim Versetzen des Äthers mit Wasser entstand.

Das Filtrat wurde mit Barytwasser neutralisiert und eingedampft. In schönen Nadeln kristallisierte ein Baryumsalz aus; es gab mit Fe_2Cl_6 eine positive Essigsäurereaktion.

Analyse des Baryumsalzes: Kristallwasser bei 110° getrocknet 17,1 Proz.; 0,1814 der trockenen Substanz ergaben 0,160 Baryumsulfat, entsprechend 51,96 Proz. Baryum.

Berechnet für essigsaures Baryum 53,79 Proz., gefunden 51,96 Proz.

Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß das essigsaure Baryum noch eine geringe Menge propion- oder buttersaures Baryum beigemengt enthielt. Die Entstehung eines solchen ist übrigens vollkommen verständlich, wenn wir uns erinnern, daß, wie ich in der ersten Mitteilung gezeigt habe, bei der Oxydation des Pigmentes mit Chromsäure eine Methyldibutylessigsäure gefunden wird. Auffallend ist es nur, daß der Abbau bei der Oxydation hier in der Kälte noch weiter vor sich ging, als vordem in der Wärme.

Zu einem mit diesem übereinstimmenden Resultate gelangte ich übrigens noch auf einem anderen Wege.

Das mit Äther ausgeschüttelte Filtrat des Oxydationsproduktes wird mit Wasser verdünnt und der Destillation unterworfen. Das Destillat reagiert stark sauer. Der abdestillierten Flüssigkeit entsprechend wird immer wieder Wasser zugefügt und die Destillation so lange fortgeführt, bis das Destillat eben noch schwach sauer reagiert. Das Destillat wird mit Barytwasser neutralisiert, durch Einleiten von CO_2 in der Wärme vom überschüssigen Baryt befreit, abfiltriert, eingeengt und nochmals filtriert. Beim Eindampfen bleibt in schönen Kristallen ein Baryumsalz zurück. Die Analyse desselben ergibt folgende Werte:

0,1193 g Substanz geben 0,0975 $BaSO_4$ = 0,0702 Ba = 51,46 Proz. Ba.

Da das durch Ausschütteln des Oxydationsproduktes mit Äther gewonnene Baryumsalz 51,96 Proz. Baryum enthielt, sind die beiden Baryumverbindungen offenbar identisch, und die Differenz von 0,5 Proz. wohl auf den bei den verschiedenen Darstellungsarten innerhalb engster Grenzen wechselnden Gehalt an kohlenstoffreicheren Fettsäuren zurückzuführen.

Der Rückstand der Destillation wurde mit Natronlauge alkalisch gemacht, vom hierbei abgeschiedenen Chromhydroxyd abfiltriert.

Beim Alkalischmachen fand eine lebhafte Ammoniakentwickelung statt. Der bei der Oxydation zurückbleibende Anteil des Pigmentes wurde folgendermaßen weiter untersucht:

Die Substanz wurde zunächst mit Alkohol, Aceton und Äther erschöpft, hierauf in wenig Soda gelöst. Der unlösliche Rückstand erwies sich als Kieselsäure. Die Sodalösung ließ sich mit Tierkohle nicht entfärben. Die Lösung wurde mit Salzsäure gefällt, die Fällung in Soda gelöst und dies einige Male wiederholt, die Fällung schließlich mit heißem Wasser chlorfrei gewaschen. Dieses Abbauprodukt ist ein schwarzes Pulver, das bei der Elementaranalyse folgende Zahlen lieferte:

0,1646 g Substanz ergaben 0,3383 g CO_2 und 0,1159 g H_2O, entsprechend 0,0923 g C und 0,0129 g H.

0,1458 g Substanz lieferten 11,34 ccm N, Temperatur 18,5°, Barometerstand 763,5 mm, entsprechend 0,0133 g N.

	Berechnet für $C_{22}H_{36}N_3O_8$	Gefunden
C	56,10 Proz.	56,04 Proz.
H	7,66 „	7,82 „
N	8,94 „	9,08 „
O	27,10 „	27,06 „

Trotz der Verschiedenheit der Formeln zwischen dem mit Brom-Bromwasserstoff behandelten Pigment und dem mit Chromsäure oxydierten, möchte ich auf die sehr nahestehende prozentuale Zusammensetzung hinweisen, die sich im wesentlichen lediglich durch den höheren Wasserstoffgehalt des letzteren Körpers unterscheidet.

Ich versuchte nun durch Kalischmelze des Pigmentes zu einem Abbau desselben zu gelangen.

Zu diesem Zwecke werden 300 g Kali mit 40 g Pigment unter Zusatz von etwas Wasser in einer Kupferretorte zusammengeschmolzen und der Destillation unterworfen. Das Destillat wird mit Wasserdampf destilliert. Hierbei gehen weiße kristallisierte Blättchen über, deren Menge so gering ist, daß eine weitere Untersuchung nicht möglich ist. Ich erwähne diesen Umstand aus dem Grunde, weil hier doch wieder ein kristallisiertes Abbauprodukt des Pigmentes vorliegt und daher dieser Umstand für spätere Beobachtungen von Wichtigkeit sein könnte.

Da das starke Schäumen der Kalischmelze die weitere Destillation außerordentlich erschwert, wird die Destillation unterbrochen und die Schmelze mit Äther ausgeschüttelt, ebenso das Produkt der früher erwähnten Wasserdampfdestillation mit den beiden Ätherextrakten vereinigt. Aus dem Äther bleibt nach dem Abdunsten eine kleine Menge eines dunkeln Sirups zurück, der intensiv nach Skatol riecht. Die nach dem Ausschütteln mit Äther zurückbleibende wässerige Lösung der Kalischmelze wird mit Schwefelsäure bis zur eben noch alkalischen Reaktion versetzt und schließlich mit etwas Essigsäure sauer gemacht. Es fällt ein reichlicher, dunkler Niederschlag aus, von dem abfiltriert wird. Das Filtrat selbst wird wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, doch bleibt nur ein wenig eines intensiv nach Skatol riechenden

Sirups zurück. Die ausgeschüttelte wässerige Lösung enthält nur noch anorganische Substanzen.

Der Niederschlag selbst wird in verdünnter Kalilauge gelöst. Es bleibt eine graulich weiße Masse zurück, die der Hauptsache nach aus Kieselsäure besteht. Zur vollständigen Reinigung wird wiederholt in schwacher Kalilauge gelöst und mit H_2SO_4 gefällt, schließlich auf dem Filter mit Alkohol gewaschen, wobei es sich zeigt, daß die Substanz sich teilweise in Alkohol löst, der eine schwarzbraune Farbe annimmt.

Die Substanz wird der Elementaranalyse unterzogen, die folgende Werte liefert: 0,2048 g Substanz ergaben 0,4140 g CO_2 und 0,0566 g H_2O, entsprechend 0,0063 g H und 0,113 g C.

0,1752 g Substanz ergaben bei 25,9° und 755 mm Barometerstand 12,93 ccm N.

	Berechnet für $C_{24}H_{16}N_3O_{11}$	Gefunden
C	55,17 Proz.	55,17 Proz.
H	2,99 „	3,07 „
N	8,05 „	8,14 „
O	33,07 „	33,62 „

Wir sehen hier, daß wir durch diese verschiedenartigen Einwirkungen zu Körpern von einer gewissen Konstanz in ihrer chemischen Zusammensetzung kommen, ohne daß es jedoch gelingt, ein tieferes molekulares Abbauprodukt zu fassen. Sehr auffällig ist bei dieser Substanz der ungemein geringe Gehalt an Wasserstoff.

Ich ging daher daran, eine Oxydation des Pigmentes mit Wasserstoffsuperoxyd zu machen, wobei ich von der Voraussetzung ausging, daß das Pigment in Substanz von diesem in ähnlicher Weise angegriffen würde wie das Pigment im schwarzen Haare, welches durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd bekanntlich intensiv gebleicht oder in Lichtgelb umgewandelt wird.

50 g durch Säurehydrolyse dargestelltes Pigment aus schwarzer Schafwolle werden mit Alkohol und Äther gut gewaschen und dann mit 200 g Perhydrol Merk dem direkten Sonnenlichte ausgesetzt. Nach einer Stunde tritt lebhafte Reaktion unter starker Wärmeentwickelung ein. Nach 48 Stunden wird abfiltriert. Das Filtrat ist stark dunkel gefärbt. Nimmt man etwas von dem zurückgebliebenen Niederschlag, löst ihn in etwas mit Kali alkalisch gemachtem Wasser auf und setzt Wasserstoffsuperoxyd zu, so tritt langsam Entfärbung ein, nicht aber ohne Zusatz von Kali. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade abgedampft; als die Lösung schon ganz eingeengt war, explodierte der Rückstand plötzlich unter Zurücklassung von etwas Kohle. Der Versuch wird wiederholt, das Reaktionsgemenge aber nicht dem Sonnenlichte ausgesetzt. Die Reaktion geht aber sehr langsam vor sich. Auch die allerdings trübe Novembersonne, der das Gemenge nun ausgesetzt wird, hat auf die Beschleunigung derselben keinen nennenswerten Einfluß, so daß selbst nach Monaten ein deutlicher Fortschritt kaum sichtbar wird. Ich habe daher das Gemenge mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und einen Kristall Eisenvitriol zugesetzt. Nun ging die Reaktion auf einmal stürmisch unter großer Wärmeentwickelung vor sich. Nachdem die-

selbe abgelaufen war, wurde vom Pigment abfiltriert. Ein Teil des Filtrats wird der Destillation unterworfen, wobei es sich dunkel färbt. Das Destillat selbst gibt Acetonreaktion nach Legal. Die Hauptmasse des Filtrats wird mit Barytwasser, zum Schluß mit kohlensaurem Baryt neutralisiert. Hierbei entwickelt sich sehr reichlich Ammoniak. Zur Ausfällung des überschüssigen Baryums wird Kohlensäure in der Wärme eingeleitet, das Filtrat eingedampft. Aus der eingedampften Lösung dieses Salzes fällt auf Alkoholzusatz ein Sirup aus. Von diesem wird abgegossen, die abgegossene Mutterlauge weiter eingedampft. Der Sirup selbst, welcher teilweise kristallisiert, wird mit etwas Wasser aufgenommen, abfiltriert und zur Kristallisation im Vakuumexsiccator stehen gelassen. Die eingedampfte Mutterlauge riecht, obwohl mit überschüssigem Baryt behandelt, intensiv nach Essigsäure. Die stark sauer reagierende Mutterlauge zeigt auch im Vakuum keine Neigung zur Kristallisation. Sie wird mit $BaCO_3$ abgesättigt, auf dem Wasserbade erwärmt und filtriert. Das Filtrat wird mit absolutem Alkohol versetzt, wobei eine erstarrende Masse ausfällt, während aus dem abgegossenen Alkohol selbst lange Kristalle ausfallen, welche aber wegen ihrer geringen Menge nicht weiter untersucht werden können. Die erstarrte Masse wird in wenig heißem Wasser gelöst, der ungelöste Rückstand ist anorganisch, das Filtrat hingegen mit absolutem Alkohol gefällt. Es ist stickstoffhaltig. Die Elementaranalyse konnte wegen der geringen Menge Substanz nicht ausgeführt werden, immerhin glaube ich jedoch, dieses Verhalten mit Rücksicht auf die künftigen Untersuchungen erwähnen zu sollen.

Das Chorioidealpigment[1]).

Das Chorioidealpigment wurde dargestellt durch Auspinseln der Chorioidea aus Schweinsaugen. Über die chemische Natur des Chorioidealpigmentes liegen bisher nur spärliche Angaben vor. N. Sieber[2]) fand es schwefel- und eisenfrei. Sie fand in Chorioidealpigment von Rindsaugen 60,34 bis 59,9 Proz. C, 5,02 bis 4,61 Proz. H, 10,81 Proz. N und 2,15 Proz. Asche. Ähnlich war die Zusammensetzung des Pigmentes von Schweinsaugen. Es ist ein schwarzes, amorphes Pulver, unlöslich in den gewöhnlichen Lösungsmitteln, sehr wenig löslich in Alkalien und konzentrierten Mineralsäuren.

Eugen Hirschfeld[3]) kam zu gleichen Resultaten und bemerkt noch, daß konzentrierte H_2SO_4 und HNO_3 es mit dunkelroter Farbe aufnehmen. Chlor und Natriumamalgam bleichen den Farbstoff,

---

[1]) Ich verdanke 5 g dieses Körpers, von Herrn Dr. Landolt dargestellt, der besonderen Freundlichkeit des Herrn Prof. Hofmeister in Straßburg, wofür ich ihm an dieser Stelle meinen besonderen Dank sage.

[2]) N. Sieber, Über das Pigment der Chorioidea und der Haare, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 20, 362.

[3]) Eugen Hirschfeld, Untersuchungen über die schwarzen Farbstoffe der Chorioidea und verwandter Pigmente, Zeitschr. f. physiol. Chem. 13, 407.

H_2O_2 fällt ihn aus alkalischer Lösung in braunen Flocken. Bei der Kalischmelze wurden neben Ammoniak und Aminbasen Oxalsäure und höhere Fettsäuren erhalten. 30 Proz. eines Farbstoffs wurden zurückgewonnen, der bei der Analyse 65,94 Proz. C, 3,84 bis 4,30 Proz. H, aber kein N ergab, was indes von Landolt[1]) nicht bestätigt werden konnte.

K. May[2]) arbeitete mit Irispigment von Hühnern, das vorher der Pankreasverdauung unterworfen war. Er fand es gegen chemische Agentien sehr resistent. In verdünnten Alkalien war es sehr leicht löslich, wenn es vorher mit verdünnter HNO_3 behandelt oder dem Sonnenlicht ausgesetzt war.

Die mir zur Verfügung stehende Menge Chorioidealpigment betrug 5 g, eine Menge, die aus vielen Hunderten Schweinsaugen mühselig dargestellt worden war. Es stellt ein tief schwarzbraunes Pulver dar, das sich in Alkalien leicht löst, durch Zusatz von H_2O_2 nicht entfärbt wird, auch nicht bei Zusatz von Eisensulfat. Um solche Mengen darzustellen, wie sie zum chemischen Abbau notwendig wären, bedürfte es indes der Verarbeitung vieler Tausender Augen.

3 g Chorioidealpigment werden in 150 g Jodwasserstoffsäure von spez. Gew. 2,00 eingetragen, nach und nach 30 g Jodphosphonium beigefügt, hierauf in der Schale auf dem Wasserbade etwa ³/₄ Stunden lang erwärmt. Man verdünnt mit destilliertem Wasser und setzt etwas weniger als die berechnete Menge Lauge zu, da ja ein Teil der Säure sich verflüchtigt hat, und destilliert bei noch schwach saurer Reaktion ab. Es waren hierzu 42 g Ätznatron erforderlich. Das Destillat gab mit Sublimat, mit Pikrinsäure, mit Sublimat und Soda keine Fällung. Ebenso war die Pyrrolreaktion negativ.

Aus diesem Versuche folgt, daß auch die Abstammung des Chorioidealpigmentes aus dem Blutfarbstoff ausgeschlossen ist. Dieser Befund ist um so wichtiger, als speziell für dieses Pigment von manchen Autoren an der hämatogenen Bildung festgehalten worden ist.

Wie wir aus diesen Versuchen ersehen, ist eine vollkommen exakte Lösung des chemischen Aufbaues des Pigmentes bis nun nicht zu gewinnen. Positiv geht aus denselben nur das eine mit absoluter Sicherheit hervor, daß ein Zusammenhang mit dem Blutfarbstoff sicher nicht existiert. Dies gilt für das Haarpigment, ebenso bestimmt wie für das Augenpigment, für welches manche

---

[1]) Landolt, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 192.

[2]) K. May, Untersuchungen aus dem physiologischen Institut der Universität Heidelberg 2, 324, refer. im Zentralblatt f. d. mediz. Wissenschaft 17, 478 durch Salkowski.

Forscher (aus Gründen, die sich nicht auf chemische Untersuchungen, sondern auf entwickelungsgeschichtliche Schlüsse stützten) den hämatogenen Ursprung annahmen. Hingegen ermöglichen diese Versuche mancherlei Ausblicke über den mutmaßlichen Ursprung des Haarpigmentes.

Zunächst ist die Tatsache bedeutsam, daß man bei der Kalischmelze des Pigmentes immer wieder auf geringe Mengen Skatol stößt. Obwohl es mir nun nicht gelungen ist, dasselbe direkt nachzuweisen, muß ich die Anwesenheit der skatolhaltigen Gruppe um so sicherer annehmen, weil der Geruch des Skatols so unleidlich empfunden wurde, daß ich genötigt war, die Kalischmelze immer unter dem Abzugherde auszuführen. Da nun das Skatol aus der Tryptophangruppe stammt, muß man annehmen, daß diese so verändert ist, daß das Skatol in für die Reaktion genügenden Mengen nicht abspaltbar ist. Von der Tryptophangruppe wissen wir, daß sie eine eminent farbstoffbildende Gruppe ist, weil sie das Indolalanin, also das Ringsystem des Indols, enthält, aus dem sich im Organismus bekanntlich ja auch Indigo bildet.

Für die leichte Aufspaltbarkeit des Indolringes spricht vielleicht auch der Umstand, daß es auch Wolff (l. c.) bei der Kalischmelze von Pigment aus melanotischen Tumoren nicht gelang, Skatol zu finden, sondern daß er nach dem Ansäuern lediglich einen intensiven Blausäuregeruch wahrnahm.

Auf einen solchen Zusammenhang hat übrigens schon vorher Sigm. Fraenkel[1]) hingewiesen, indem er ausführte, daß die Pigmente einerseits mit dem Tryptophan in Beziehung stehen, das als Skatol bzw. Indolderivat sehr zur Farbstoffbildung neigt, andererseits mit dem von mir nachgewiesenen Kohlenwasserstoff, als dessen Oxydationsprodukt ich die Methyldibutylessigsäure dargestellt habe, aus dem auch Wolffs Xyliton stammen dürfte, zusammenhängen. Ferner ist es seit langem bekannt, daß die Tyrosinase und andere Oxydasen aus verschiedenen aromatischen Verbindungen Farbstoffe bilden, so aus dem Tyrosin und anderen mehr, während das Adrenalin schon an der Luft in einen Farbstoff übergeht.

v. Fürth und Schneider[2]) haben ja schon vor längerer Zeit das Vorkommen von tierischer Tyrosinase nachgewiesen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß Oxydasen dieser Art in den pigment-

---

[1]) Sigm. Fraenkel, Descript. Biochemie, S. 463.

[2]) Fürth und Schneider, diese Beiträge 1, 229. Gleichzeitig sei auf Fürths ausführliches Sammelreferat über das Pigment im Zentralbl. f. Pathologie u. pathol. Anatomie 15 (1904) hingewiesen.

haltigen Geweben vorkommen. Tyrosin gibt mit diesem Ferment selbst einen Körper, der beim Schmelzen mit Natron Indol abspaltet.

Das Pigment enthält aber, wie wir gesehen haben, noch eine zweite freie Gruppe, und zwar eine Substanz, die mit der Färbung in keinem Zusammenhange zu stehen scheint und welche zum Aceton oder, allgemeiner gesagt, zu solchen Körpern, welche sehr reich an Methylgruppen sind, in engster Beziehung steht. Hierfür spricht die in der ersten Mitteilung des näheren ausgeführte Tatsache, daß bei der Oxydation des Pigmentes dieses zu der an Methylgruppen so reichen Methyldibutylessigsäure abgebaut wird; hierfür spricht weiter der Umstand, daß ich unter den Abbauprodukten wiederholt Essigsäure und einmal sogar direkt Aceton fand. Auch die Substanz, welche von Wolff mit größter Wahrscheinlichkeit als mit dem Xyliton identisch bezeichnet werden konnte, die er aus dem Pigment melanotischer Lebern dargestellt hatte (l. c.), ist ein mit Methylgruppen überladener Körper. Die Annahme Wolffs, daß sein Körper mit dem Xyliton identisch sei, gewinnt hierdurch eine weitere Bestätigung.

Nun gehört das Aceton und seine Verbindungen zu den normalen Bestandteilen des tierischen Organismus. Das Aceton ist aber ein Körper, welcher in ganz besonders hohem Maße die Eigenschaft besitzt, Kondensationen einzugehen. So läßt sich das Aceton leicht in

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!>C{=}CH.CO.CH_3$$

Mesityloxyd

und

$$\begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!>C{=}CH\diagdown \qquad\qquad \\ \qquad\qquad\qquad >CO \\ \begin{matrix}CH_3\\CH_3\end{matrix}\!>C{=}CH\diagup \qquad\qquad$$

Phoron

überführen. Ebenso entsteht, wenn man mit Salzsäure gesättigtes Aceton einige Tage stehen läßt, außer diesen Körpern noch Xyliton und Dixyliton. Die große Mannigfaltigkeit der Pigmente und die disparaten Resultate verschiedener Forscher lassen sich nun ungezwungen aus der großen Kondensationsfähigkeit und aus den verschiedenen Kondensationsstufen dieser zwei Substanzen, der Indolaminopropionsäure und des Acetons, insbesondere aber des Acetons, erklären. Bei der großen Mannigfaltigkeit dieser Kondensationsprodukte ist es durchaus verständlich, daß verschiedene Zwischenstufen der Kondensation des Acetons, die ja chemisch verschiedenen Charakter haben — man vergleiche Haarpigment, Augenpigment, Pigment aus melanotischen Tumoren —, sich an dem Aufbau des Pigmentes beteiligen. Einen Beweis dafür liefern

z. B. die oben erwähnten Kondensationen zu Mesityloxyd, Phoron, Xyliton. Der Indolring ist ferner Aldehyd- und Ketongruppen gegenüber chemisch äußerst reaktionsfähig und neigt hierbei ungemein zur Bildung von Farbstoffen.

Lewin[1]) hat jüngst gezeigt, daß Mesityloxyd sowohl innerhalb als auch außerhalb des Organismus leicht in geschwefelte Ketone übergeht. Sie entstehen schon im Munde, wenn man in ihn den Dampf von Mesityloxyd eintreten läßt. Rührt man fein zerhacktes Fleisch mit Wasser und ein bis zwei Tropfen Mesityloxyd an, so ist nach einiger Zeit das geschwefelte Keton durch den Geruch erkennbar. Verwendet man hierzu gereinigten Dünndarm des Kaninchens, so nimmt man schon nach einer halben Stunde den Geruch unangenehm stark wahr. Nun gibt es anscheinend schwefelhaltige und schwefelfreie Pigmente. Der Schwefelgehalt ließe sich ungezwungen dadurch erklären, daß die Acetongruppen mit dem Schwefel geschwefelte Ketone geben, die dann in die Pigmentbildung eintreten.

Zusammenfassung.

1. Das Augenpigment gibt ebensowenig wie das Haarpigment die Hämopyrrolreaktion. Es stammt daher nicht aus dem Blutfarbstoff.

2. Bei der Aufspaltung des Pigmentes findet man die Acetongruppe, vermutlich aus kondensierten Acetonresten stammend, in verschiedenen Kondensationsstufen.

3. Als Muttersubstanz des Pigmentes erweisen sich Tryptophan und Aceton. Möglicherweise beteiligen sich an der Pigmentbildung auch die anderen aromatischen Gruppen des Eiweißes, Phenylalanin und Tyrosin.

4. Das Pigment aus melanotischen Lebern ist vom Haarpigment verschieden.

5. Die Verschiedenheit der Pigmente beruht wahrscheinlich auf verschiedenen Kondensationsstufen des an der Pigmentbildung beteiligten Acetons. Nie jedoch findet man Hämopyrrolreaktion.

6. Die Ansicht vom hämatogenen Ursprung des Pigmentes ist durch diese Versuche endgültig widerlegt.

---

[1]) Lewin, Über das Verhalten von Mesityloxyd und Phoron im Tierkörper im Vergleich zu Aceton. Arch. f. exper. Pathologie und Pharmakologie 56, 346.

XIII.

Über den Einfluß der Außentemperatur auf den Blutzuckergehalt.

Von Privatdozent Dr. **Gustav Embden,** Professor Dr. **Hugo Lüthje** und Dr. **Emil Liefmann.**

Aus dem chemisch-physiologischen Institut und der medizinischen Klinik der städtischen Krankenanstalten zu Frankfurt a. M.

Je mehr sich die Methodik der Untersuchung des Gesamtstoffwechsels und insbesondere der Kalorimetrie vervollkommnet, um so genauere Aufschlüsse gewinnen wir über den Energieumsatz im Tierkörper unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Dies gilt im besonderen Maße auch von dem Wärmehaushalt im Organismus.

Es läßt sich leicht feststellen, daß den gesteigerten Anforderungen an die Wärmeproduktion, die der Aufenthalt eines Warmblüters in der Kälte bedingt, durch eine Steigerung der Verbrennungsprozesse genügt wird. Über die Natur dieser Verbrennungsprozesse, über den Ort, an dem sie sich abspielen, können uns aber Gesamtstoffwechselversuche nur wenig Aufschluß geben. Selbst wenn wir z. B. aus dem Verhalten des respiratorischen Quotienten mit mehr oder weniger großer Sicherheit schließen können, daß im gegebenen Falle der Abbau vorwiegend auf Kosten des Kohlehydrat- oder Fettvorrates im Tierkörper geschieht, so gewinnen wir damit keinen Einblick in die Art und Weise, wie dieser Abbau erfolgt. Durch Reduktionsvorgänge und Synthesen, durch die Umwandlung eines Nahrungsstoffes in einen anderen, kann die Gesamtbilanz in verschiedenster Weise beeinflußt werden.

Gerade die intermediären Vorgänge sind es aber, die uns in erster Linie einen Einblick in das eigentliche biologische Wesen der Wärmeregulierung zu vermitteln geeignet sind, und es muß daher unsere Aufgabe sein, diesen Vorgängen nachzugehen.

Die Erkenntnis normaler intermediärer Vorgänge wurde auch hier wesentlich gefördert durch experimentelle Beobachtungen unter pathologischen Verhältnissen. Es gelang einerseits Lüthje[1]), den Nachweis zu führen, daß die Größe der Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde in hohem Maße abhängig ist von der Außentemperatur, in der sie sich aufhalten. Je mehr die Außentemperatur gesteigert wurde, um so geringer ward die Menge des durch den Harn entleerten Zuckers, je geringer die Außentemperatur war, um so höher wurden die Harnzuckerwerte. Lüthje deutete seine Versuche bereits im wärmeökonomischen Sinne, indem er annahm, daß die Steigerung der Kohlehydratproduktion in der Kälte auch unter normalen Umständen stattfände.

Es war eine seit langer Zeit bekannte Tatsache, daß beim Diabetes mellitus das Auftreten von Zucker im Harn abhängig ist von der Höhe des Blutzuckergehaltes, und einer weit verbreiteten Anschauung zufolge sollte der normale Blutzuckergehalt zwischen 0,05 und 0,15 Proz. schwanken. Liefmann und Stern[2]) zeigten aber in Übereinstimmung mit älteren Angaben Naunyns, daß die Grenzen des normalen Blutzuckergehaltes weit engere sind; die von ihnen gewonnenen Werte bewegten sich zwischen 0,06 bis 0,10 Proz.

Gleichzeitig mit diesen Untersuchungen suchten Embden und Liefmann — damals noch an der von Noordenschen Krankenabteilung — unter Berücksichtigung der oben geschilderten Resultate Lüthjes den Einfluß der Außentemperatur auf den Blutzuckergehalt des normalen Säugetieres festzustellen. Die im Winter 1905/06 begonnenen Versuche wurden im Winterhalbjahr 1906/07 in Gemeinschaft mit Lüthje fortgeführt, und ihr Ergebnis soll im Folgenden mitgeteilt werden.

Methodik.

Wir benutzten zu unseren Versuchen ausschließlich Hunde, deren Gewicht zwischen etwa 5 und 7 kg schwankte. Die Hunde wurden während der ganzen oft über viele Wochen sich erstreckenden Versuchszeit vollkommen gleichmäßig ernährt. Alle erhielten pro Tag 400 g Pferdefleisch, die ihnen täglich um 12 Uhr mittags verabreicht und stets sofort gefressen wurden. Der Wechsel der

[1]) Lüthje, H., Über den Einfluß der Außentemperatur auf die Größe der Zuckerausscheidung. XXII. Kongreß für innere Medizin, Wiesbaden 1905, S. 268.

[2]) Liefmann, E. und Stern, R., Über Glykämie und Glykosurie. Biochem. Zeitschr. 1, 299 (1906).

Umgebungstemperatur wurde dadurch erreicht, daß die Hunde bald in einem durch Gasöfen bis auf über 30° heizbaren, bald in einem ungeheizten, der Winterkälte möglichst zugänglichen Raum — stets in Stoffwechselkäfigen — gehalten wurden. Während die Temperatur des Warmraumes nur um wenige Grade schwankte, ließen sich stärkere Temperaturbewegungen im Kaltraum unter den bisher von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht vermeiden.

Die Blutentnahme geschah, um etwaige Einflüsse der Ernährung auf den Blutzuckergehalt auszuschalten oder doch möglichst gleichartig zu gestalten, stets unmittelbar vor der Nahrungsaufnahme, also kurz vor 12 Uhr mittags.

Es erschien uns von großer Wichtigkeit, die Blutentnahme in einer das Tier möglichst wenig belästigenden Weise auszuführen, namentlich mußten uns die Beobachtungen über den Fesselungsdiabetes der Katzen und Kaninchen davor warnen, unsere Tiere irgend längere Zeit zu fesseln.

Die Hunde blieben stets vor der Blutentnahme mehrere Stunden allein, um auch psychische Erregungen möglichst auszuschalten.

Die Blutentnahme selbst wurde in folgender Weise ausgeführt:

Der Hund wurde von einem Assistenten auf den Schoß genommen und von mehreren anderen in möglichst schonender Weise festgehalten. Der Kopf wurde stark nach hinten gebeugt, die Vena jugularis externa durch Kompression mittels des Daumens zur Anschwellung gebracht und mit einer kurzen und dicken Punktionsnadel punktiert. Von dem im Strahle ausfließenden Blute gingen die ersten Cubikcentimeter verloren. Die folgenden 50 ccm flossen in einen Meßkolben von 200 ccm, der vorher mit genau 100 ccm Salzsäure von 2 Proz. und 50 ccm Wasser beschickt worden war. Durch sorgfältiges Schütteln wurde jede Blutgerinnung verhindert.

Absichtlich haben wir immer die gleiche Menge Blut entnommen, weil bekanntlich der Blutzuckergehalt unter dem Einflusse der Blutentnahme sich ändern kann. Irgend welche erhebliche Nachblutung haben wir ebensowenig wie entzündliche Vorgänge an der Punktionsstelle jemals beobachtet.

Bei den ersten drei Versuchstieren erfolgte die Punktion meist in Zwischenräumen von wenigen (2 bis 3) Tagen. Es ist aber allem Anscheine nach zweckmäßiger, wie wir aus den Resultaten von Versuch IV und V entnehmen, zwischen die einzelnen Blutentnahmen längere Pausen einzuschalten. Bei diesen beiden Versuchen ließen wir die Hunde sich stets annähernd eine Woche nach der Punktion erholen. Diese Zeit reicht zur Rückkehr normaler Verhältnisse vollkommen aus.

Die weitere Ausführung der Blutzuckerbestimmung geschah im wesentlichen nach dem Vorgange Schenks ganz in der früher von Embden[1]) und Liefmann und Stern (l. c.) geübten Weise.

[1]) Embden, G., Über Zuckerbildung in der glykogenfreien Leber. Diese Beiträge 6, 49 (1904).

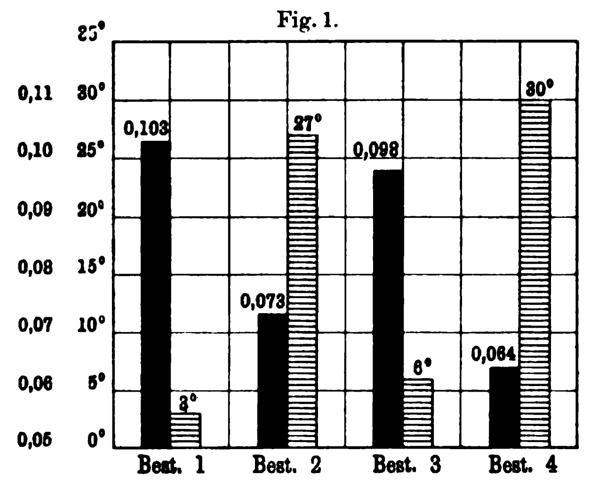
Die Menge der zur Reduktion von 2 ccm Knappscher Lösung gerade eben ausreichenden Titrationsflüssigkeit wurde genau bis auf 0,1 ccm festgestellt. Die Endreaktion war so überaus scharf, daß mit größeren Titrationsfehlern als 0,1 ccm kaum zu rechnen war. Die Titrationsfehler waren unter diesen Umständen so geringe, daß sie für die Beurteilung unserer Versuche praktisch nicht in Betracht kommen.

Ergebnisse.

Die Versuchsergebnisse sind in Fig. 1 bis 5 graphisch dargestellt. Als Abszisse für die Temperatur ist hierbei 0° und als Abszisse für den Blutzuckergehalt 0,05 Proz. angenommen.

Die Höhe des Blutzuckergehaltes ist überall ordinatenartig durch gleichmäßig schwarze, die der Temperatur durch quergestreifte Säulen ausgedrückt. Ein Blick lehrt, daß ohne Zweifel

Fig. 1.



der Gehalt des Blutes an Zucker in hervorragendem Maße abhängig ist von der Außentemperatur. Überall da, wo die quergestreifte Säule der Außentemperatur niedrig ist, ist die geschwärzte Säule des Blutzuckergehaltes hoch und umgekehrt.

Am prägnantesten treten diese Verhältnisse hervor in den Versuchen IV und V (Fig. 1 und 2), in denen wir, wie bereits oben erwähnt, längere Intervalle zwischen die einzelnen Punktionen einschalteten und in denen ferner die Unterschiede der Außentemperatur besonders große waren.

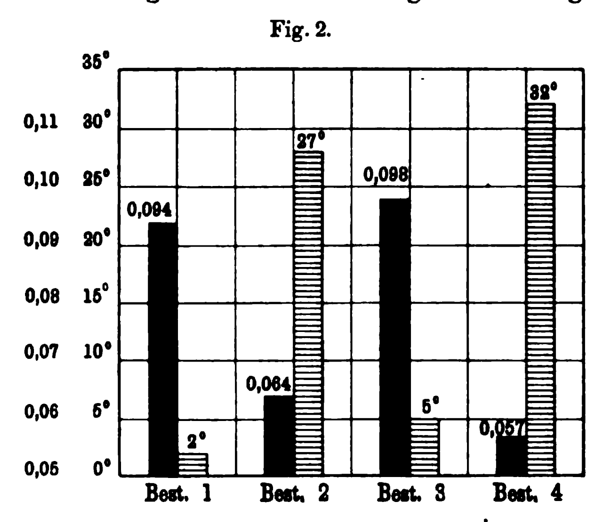
Betrachten wir zunächst Fig. 1, Versuch IV, so sehen wir, daß in Bestimmung 1, wo die Außentemperatur am niedrigsten (3°) ist, der Blutzucker den höchsten Wert (0,103 Proz.) erreicht, während umgekehrt in Bestimmung 4 bei der höchsten Außentemperatur

(30°) der Blutzuckergehalt den niedrigsten Wert (0,064 Proz.) aufweist. Bestimmung 3, die bei einer Außentemperatur von 6° vorgenommen wurde, lieferte einen etwas niedrigeren Blutzuckerwert (0,098 Proz.) als Bestimmung 1, Bestimmung 2 — Umgebungstemperatur 27° — einen etwas höheren als Bestimmung 4.

In Versuch IV ist also die Höhe des Blutzuckergehaltes geradezu der Umgebungstemperatur umgekehrt proportional.

Die Unterschiede in der Höhe des Blutzuckergehaltes in der Kälte und Wärme sind so erhebliche, daß sie weit außerhalb der Fehlergrenze der angewandten Bestimmungsmethode liegen.

Fig. 2.



Setzen wir die Höhe des Blutzuckergehaltes in Bestimmung 1 = 100, so ist diese Größe in Bestimmung 2 = 71, in Bestimmung 3 = 95, in Bestimmung 4 = 62.

In Versuch V (Fig. 2) findet sich der niedrigste Blutzuckerwert (0,057 Proz.) bei der höchsten Raumtemperatur (32°) (Bestimmung 4), bei 27° (Bestimmung 2) ist der Blutzuckergehalt = 0,064 Proz., der höchste Wert (0,098 Proz.) ward ermittelt bei 5°, während bei 2° der Blutzuckergehalt 0,094 Proz. beträgt. Hier wird also das Blutzuckermaximum bei 5°, wo der Blutzuckergehalt um ein geringeres höher ist als der bei 2° ermittelte, erreicht.

Diese Differenz ist allerdings als eine recht geringe zu bezeichnen.

Im übrigen geht die Abhängigkeit des Blutzuckergehaltes von der Außentemperatur aus Versuch V mit derselben Deutlichkeit wie aus Versuch IV hervor.

Wird auch hier der höchste Blutzuckergehalt (0,098 Proz.) = 100 gesetzt, so ist diese Größe in Bestimmung 1 = 96, in Bestimmung 2 = 65 und in Bestimmung 4 = 58.

Fig. 3.

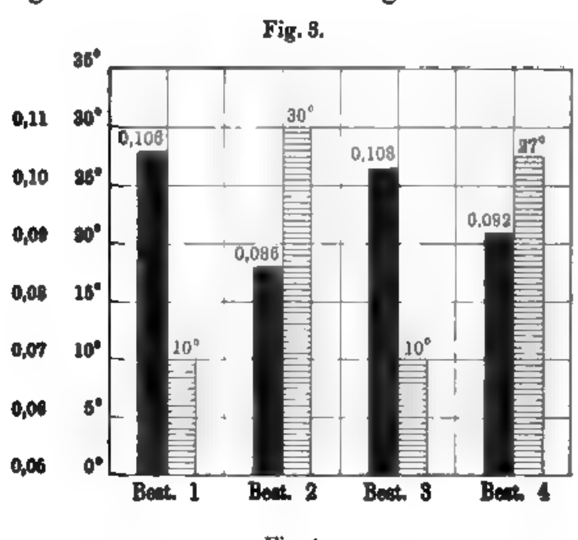
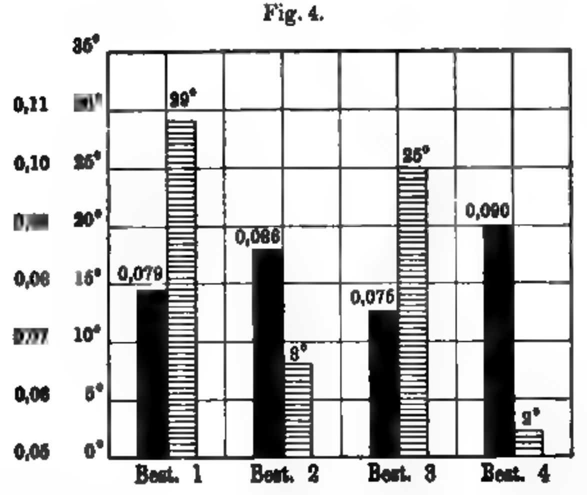


Fig. 4.



In Bestimmung 4 wurde der Hund bei der höchsten Temperatur gehalten, die überhaupt in sämtlichen Versuchen zur Verwendung kam, der Blutzuckergehalt erreicht hier den niedrigsten beobachteten Wert.

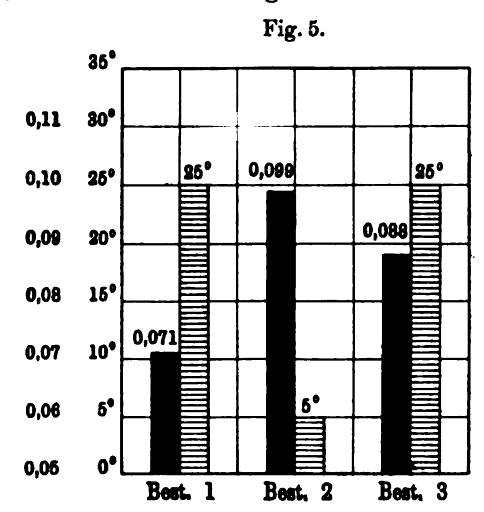
Wir wenden uns nunmehr zu den zuerst vorgenommenen Versuchen I, II und III (Fig. 3, 4 und 5), in denen der Blutzucker-

gehalt im ganzen durchaus derselben Gesetzmäßigkeit folgt, wie in Versuch IV und V, wenn auch die geringeren Unterschiede in der Umgebungstemperatur geringere Differenzen im Blutzuckergehalt bedingen und letztere am Schlusse der Versuche I und III sich augenscheinlich unter dem Einflusse der zu rasch aufeinanderfolgenden Punktionen zum Teil etwas verwischen.

Die Einzelheiten der Versuche gehen aus den Figuren 3, 4 und 5 hervor.

Fragen wir uns nach der biologischen Bedeutung der Abhängigkeit des Blutzuckergehalts von der Außentemperatur, so liegt es sicherlich am nächsten, unseren Beobachtungen eine wärmeregulatorische Bedeutung zuzumessen. Die in der Kälte gesteigerten Verbrennungsprozesse bedingen naturgemäß einen gesteigerten Verbrauch an Brennmaterial und dieses Brennmaterial ist wenigstens zum Teil Zucker. Wenn der Zucker am Orte seiner Produktion, als welchen wir allem Anscheine nach in erster Linie die Leber zu betrachten haben, verbrannt würde, so würde sich voraussichtlich die gesteigerte Kohlehydratverbrennung nicht in einer Veränderung des Blutzuckerbestandes äußern.

Fig. 5.



Augenscheinlich aber erfolgt die vermehrte Kohlehydratverbrennung in der Kälte fern von der Stätte der Kohlehydratproduktion und es ist der vermehrte Blutzuckergehalt als der Ausdruck eines vermehrten Kohlehydrattransportes in die peripherischen Verbrennungsstätten — in erster Linie vielleicht in die Muskulatur — zu betrachten.

Der in der Kälte gesteigerte Blutzuckergehalt würde sicherlich zur Bestreitung sehr umfangreicher Verbrennungsprozesse ausreichen, um so mehr, als wir nur das venöse Blut, das vielleicht schon einen Teil seines Zuckers an die Muskulatur abgegeben hat, untersuchten.

Das Ergebnis unserer Versuche steht mit manchem früher gewonnenen Resultate im besten Einklang.

Wir wollen nur hinweisen auf die Beobachtung, daß in der Kälte das Glykogen aus der Leber schwindet, vor allem aber auf die bereits eingangs erwähnten Erfahrungen Lüthjes an pankreaslosen Hunden.

Während in unseren Versuchen am normalen Tiere dem gesteigerten Zuckertransport in der Kälte eine gesteigerte Zuckerverbrennung entspricht, vermögen die Organe des diabetischen Hundes die gesteigerte Zufuhr an Brennmaterial nicht zu bewältigen und diese gesteigerte Zufuhr bewirkt nur verstärkte Hyperglykämie und daher gesteigerte Zuckerausscheidung.

Dies kommt übrigens, wie hier erwähnt sei, auch darin zum Ausdruck, daß pankreaslose Hunde auf Herabsetzung ihrer Umgebungstemperatur — ganz im Gegensatz zu normalen — mit einer wesentlichen Verminderung ihrer Eigenwärme antworten.

Das Ansteigen des Blutzuckers in der Kälte ist der vermehrten Gaszufuhr vergleichbar, die ein sich selbsttätig regulierender Brutofen in einem kalten Raume erhält. Während der gesunde Organismus, wie ein richtig arbeitender Thermostat, in der Kälte gleichsam mit größerer Flamme brennt, verläßt beim pankreaslosen Tier der zu wärmeregulatorischen Zwecken bestimmte Zucker ungenutzt oder doch schlecht ausgenutzt den Körper.

XIV.

Über die Ausscheidung von Alanin durch den Harn.

Von Dr. **Siegfried Oppenheimer.**

Aus dem chemisch-physiologischen Institut (Vorstand: Privatdozent Dr. Embden) und der medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. Lüthje) des städtischen Krankenhauses zu Frankfurt a. M.

Vor einiger Zeit veröffentlichte Rahel Hirsch[1]) Untersuchungen über das Verhalten von Monaminosäuren im hungernden Organismus. Die Verfasserin glaubte in diesen Versuchen feststellen zu können, daß d-l-Alanin in Quantitäten, welche der normal gefütterte Hund vollkommen assimilierte, beim Hungertiere zum Teil im Harn wieder aufträte. Wenigstens konnte in einem Versuche, in dem einem Hungerhunde 15 g Alanin subkutan injiziert worden waren und auch in einem Versuche, in dem ein mit Phlorizin vergifteter Hungerhund 10 g d-l-Alanin per os erhalten hatte, Alanin im Harn nachgewiesen werden. Hingegen gelang es in einem weiteren am Hungerhunde vorgenommenen Versuche, in dem gleichfalls 10 g d-l-Alanin zur Verfütterung gelangten, nicht die Substanz im Harn wieder aufzufinden. Es können also bereits die ursprünglich von Rahel Hirsch gewonnenen Ergebnisse als einheitlich nicht bezeichnet werden.

Nachdem Embden und Reese[2]) gefunden hatten, daß es bei der auch von Rahel Hirsch angewendeten β-Naphthalinsulfochloridmethode auf das Einhalten bestimmter Reaktionsbedingungen in hohem Maße ankommt, und unter eben diesen Reaktionsbedingungen

---

[1]) Hirsch, R., Über das Verhalten der Monaminosäuren im hungernden Organismus. Zeitschr. f. exp. Path. u. Therap. 1, 141 (1905).

[2]) Embden, G., Über Aminosäuren im Harne. Verhandl. 22. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1905. S. 304. — Derselbe u. Reese, H., Über die Gewinnung von Aminosäuren aus normalem Harn. Diese Beiträge 7, 411 (1905).

reichliche Mengen von Naphthalinsulfoverbindungen aus normalem Harn gewonnen hatten, von denen das Naphthalinsulfoglycin rein dargestellt werden konnte, gelangten Plaut und Reese[1]) unter Embdens Leitung zu dem Ergebnis, daß d-l-Alanin auch nach der Verfütterung recht geringer Mengen vom wohl genährten Hunde und in relativ viel höherem Grade vom Menschen teilweise wieder ausgeschieden wird. Es zeigte sich, was auch nach den oben zitierten Versuchen von Rahel Hirsch wahrscheinlich war, daß unter Spaltung der verfütterten Racemform die im Organismus nicht vorkommende l-Form in den Harn übertrat. Trotzdem in der Arbeit von Plaut und Reese die Reindarstellung und in drei Fällen die Elementaranalyse des Naphthalinsulfoalanins vorgenommen war, ziehen in einer neuerdings veröffentlichten Untersuchung Brugsch und Rahel Hirsch[2]) die Richtigkeit der Ergebnisse von Plaut und Reese in Zweifel, wobei es nach ihrer Darstellung den Anschein gewinnen kann, als ob Plaut und Reese sich mit der Wägung des aus dem Harn gewonnenen Rohproduktes begnügt hätten, ohne eine Reindarstellung der Alaninverbindung zu versuchen.

Da aus den Protokollen von Plaut und Reese nur die gewonnenen Mengen Rohprodukt, nicht aber die Menge der erhaltenen reinen Substanz hervorgingen, so habe ich, um diese Lücke auszufüllen und um die vorliegende Frage einer nochmaligen Prüfung zu unterziehen, einige neue Versuche an zwei völlig gesunden und gut genährten Versuchspersonen vorgenommen.

Ich verabreichte dieselbe Menge d-l-Alanin (10 g) wie Brugsch und Hirsch in ihren Versuchen, und zwar unmittelbar nach einer sehr reichlichen Mahlzeit, d. h. unter Bedingungen, die den von den genannten Autoren bei ihrem Versuche an einer gesunden Frau gewählten möglichst ähnlich waren.

Da nach früheren Beobachtungen von Plaut und Reese der größere Teil des ausgeschiedenen Alanins in den ersten nach der Verabreichung des Alanins gelassenen Harnportionen sich vorfindet, so habe ich in einem Falle nur den Harn der ersten $5^1/_2$ Stunden, in einem anderen den der ersten 7 Stunden verarbeitet.

[1]) Embden, G., Über Aminosäuren im Harne. Verhandl. 22. Kongreß für innere Medizin. Wiesbaden 1905. S. 304. — Plaut, M., u. Reese, H., Über das Verhalten in den Tierkörper eingeführter Aminosäuren. Diese Beiträge 7, 425.

[2]) Brugsch, Th., u. Hirsch, R., Gesamt-N- und Aminosäurenausscheidung im Hunger. Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther. 3, 642 (1906).

Bezüglich der Methodik verweise ich auf die früheren Angaben von Plaut und Reese.

Trotzdem in beiden Fällen die verarbeiteten Harnportionen das ausgeschiedene Alanin keineswegs vollständig, wenn auch in der Hauptmasse, enthielten, trotzdem im ganzen nur etwa 8 bis 10 Stunden mit β-Naphthalinsulfochlorid geschüttelt wurde, wobei die Reaktion noch keineswegs vollkommen zu Ende geführt war, und trotzdem es bei der Reindarstellung der Alaninverbindung zu großen Verlusten kam, wurden in beiden Fällen sehr erhebliche Mengen der reinen Verbindung gewonnen.

Versuch I.

Kräftiger Mann von etwa 70 kg Körpergewicht nimmt unmittelbar nach reichlicher Mittagsmahlzeit 10 g d-l-Alanin in wässeriger Lösung. Der Harn der nächsten $5^1/_2$ Stunden (350 ccm) wird gesammelt. Aus 300 ccm des nach der üblichen Vorbehandlung (s. Plaut und Reese, l. c.) verarbeiteten Harns werden 0,936 g der reinen, völlig trockenen kristallwasserfreien Verbindung gewonnen, was auf die gesamte Menge von 350 g umgerechnet 1,091 g ergibt. Die Verbindung begann bei etwa 117° zu sintern und schmolz bei 126 bis 127°.

Die mit dem Präparat vorgenommene Elementaranalyse hatte folgendes Ergebnis:

0,1902 g lieferten 0,3889 g CO_2 und 0,0856 g H_2O.

Gefunden:	Berechnet für $C_{10}H_7SO_2NH-CH(CH_3)COOH$
55,76 Proz. C	55,91 Proz. C
4,99 „ H.	4,66 „ H.

Versuch II.

Ein anderer, völlig gesunder Mann von 65 kg Körpergewicht, nimmt unter den gleichen Versuchsbedingungen wie die Versuchsperson I 10 g d-l-Alanin.

Die Harnmenge der ersten 7 Stunden nach der Alanineinnahme betrug 500 ccm. Davon wurden 365 ccm verarbeitet. Gewonnene Menge reiner kristallwasserfreier Substanz: 1,936 g, berechnet auf 500 ccm: 2,65 g. Die Substanz fing mehrere Grade früher an zu sintern als die im Versuch I gewonnene (der Beginn des Sinterns war nicht völlig scharf zu erkennen), schmolz aber ebenfalls bei 126 bis 127°.

Elementaranalyse: 0,2352 g Substanz lieferten 0,4837 g CO_2 und 0,1058 g H_2O.

Gefunden:	Berechnet für $C_{10}H_7SO_2NH-CH(CH_3)COOH$
56,08 Proz. C	55,91 Proz. C
4,97 „ H.	4,66 „ H.

Wie man sieht, ist die Menge der aus dem Harn der ersten 7 Stunden in Versuch II gewonnenen reinen Verbindung nur

unwesentlich geringer als die aus der Gesamttagesmenge des Harns der Hungerkünstlerin, an der Brugsch und Hirsch ihren Versuch mit Alanin am achten Hungertag anstellten (2,65 g gegen 3,08 g). Die in unserem ersten Versuche aus dem Harn gewonnene Menge ist ebenfalls sehr erheblich. Da bei der durchaus nicht quantitativen Beschaffenheit der in Frage kommenden Methode auf den quantitativen Unterschied, namentlich zwischen dem zweiten unserer am wohlgenährten Menschen vorgenommenen Versuche und dem von Brugsch und Hirsch an der Hungerkünstlerin angestellten wohl kaum besonderer Wert zu legen sein dürfte, so konnte ich die früher von Plaut und Reese an der Hand ihrer Tierversuche ausgesprochene Anschauung, daß in dem Verhalten des wohlgenährten und des hungernden Organismus gegenüber zugeführtem d-l-Alanin irgend eine wesentliche Differenz nicht vorhanden ist, vollauf bestätigen.

Wenn es Brugsch und Hirsch bei Verabreichung von 10 g d-l-Alanin an eine gesunde Frau unter Versuchsbedingungen, die den unseren vollkommen ähnlich waren, nicht gelang, in nennenswerter Menge Alanin im Harn wiederzufinden, so war dies ohne Zweifel durch die Art, in der die Verfasser die Naphthalinsulfochloridmethode anwendeten, bedingt, genau so wie auch in den früheren Alaninfütterungsversuchen von Rahel Hirsch allem Anscheine nach nicht ein differentes Verhalten der verschiedenen Versuchstiere, sondern die in den einzelnen Versuchen differente Art des methodischen Vorgehens an den verschiedenen Versuchsergebnissen schuld war.

XV.

Zur Lehre vom Kohlehydratstoffwechsel[1]).

Von **K. Spiro.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Bei einer Versuchsreihe, die ich im vorigen Jahre über das Schicksal einiger aromatischer Substanzen im Tierkörper anstellte, fand ich, daß eine Reihe von Vertretern dieser Körperklasse im Organismus des Hundes teilweise verbrannt wird. Da es sich dabei teils um stickstofffreie Substanzen handelte (Phenyläthylalkohole), teils um N-haltige, die im Organismus in stickstofffreie übergehen (Phenyläthylamin in Phenylessigsäure), konnte ich den Anteil, der im Körper verbrannt wurde, nicht durch Stickstoffbestimmungen des Harns ermitteln. Ich versuchte daher dies Ziel durch Kohlenstoffbestimmungen des Harns zu erreichen und fand, daß in der Tat diese Bestimmung uns ein vorzügliches Maß der Verbrennbarkeit organischer Substanzen im Tierkörper zu geben vermag.

Voraussetzung ist hierbei, daß die Kohlenstoffausscheidung im Harn ebenso gleichmäßig verläuft, wie wir dies für die Stickstoffausscheidung wissen. M. Rubner[2]) hat in seinen grundlegenden Untersuchungen gefunden, daß die von ihm zuerst eingehend geprüften Relationen C/N[3]) (Fleisch = 0,61, Hunger = 0,752[4]), Fett

---

[1]) Nach einem Vortrag, gehalten im medizinisch-naturwissenschaftlichen Verein zu Straßburg am 31. März 1907.

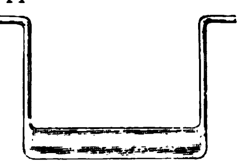
[2]) Zeitschr. f. Biologie **21**, 329 (1885).

[3]) Vgl. C. Voit, ebenda **8**, 297 (1872) und mit M. v. Pettenkofer, ebenda **5**, 369 (1869); **9**, 1, 435 (1873).

[4]) M. Rubner, Die Gesetze des Energieverbrauchs bei der Ernährung. Wien, Deuticke, 1902. — Vgl. ferner außer der unten zitierten Literatur: Frz. Meyer, Pflügers Archiv **55**, 212 (1894). J. Ranke, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1862, S. 311. M. Rubner, Zeitschr. f. Biol. **17**, 214 (1881); **19**, 313 (1883); **22**, 40 (1886). W. Scholz, Zentralbl. f. inn. Med. **18**, 353 (1897); Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **40**, 326 (1898). Namentlich aber die wichtige Arbeit von F. Tangl, Arch. f. (Anat. u.) Physiol. 1899, Suppl., S. 241.

und Kohlehydrate etwa = 0,72) sich als so konstant erwiesen, daß es angängig ist, mit Mittelzahlen zu rechnen. Dies trifft unbedingt für Fragen des Energieverbrauchs zu, wo ja der kalorische Quotient zudem ein hinreichendes Maß der Zusammensetzung des Harns gibt, so daß in diesen Fällen praktisch mit Durchschnittswerten gearbeitet werden kann. Für die oben berührten Fragen des intermediären Stoffwechsels müssen wir aber jedesmal über genaue Daten verfügen, und ich habe das Verhältnis der Kohlenstoff- zur Stickstoffausscheidung bei dieser Gelegenheit noch einmal einer genauen Prüfung unterzogen, zumal über die grundlegende Frage des Einflusses der Nahrung in einigen Punkten noch wesentliche Differenzen, z. B. zwischen F. Tangl und M. Rubner[1]), bestehen.

Die Verbrennungen wurden im offenen Rohr auf dem Dennstedtschen Apparat im Sauerstoffstrom ausgeführt; der Harn (5 oder 10 ccm) wurde in großen Schiffchen aus Nickelblech oder Hartglas eingebracht. Vorgelegt wurden Kupferoxyd und Bleisuperoxyd; zur Aufnahme des Wassers war vor dem $CaCl_2$-Rohr ein Gefäß beistehender Form (siehe Abbildung) angebracht, das in Eis gekühlt wurde. Die geringe Absorption von Kohlensäure in Wasser kann, wie viele besondere Versuche an gereinigten Substanzen lehrten, vollkommen vernachlässigt werden.



Das Verhältnis C/N bei verschiedener Ernährung.

Zu den Versuchen dienten zwei Hunde von 4 und 10 kg; eine Hungerreihe (die zweite) wurde an einem dritten Hunde von 6 kg ausgeführt. Als Nahrung diente entweder Fleisch, wobei außer Pferdefleisch (100 bis 200 g) noch Fischfleisch[2]) (500 g) verwendet wurde, oder die kohlehydratreichen Hundekuchen (N-gehalt = 3,75 Proz., 300 g), wobei ich dem Hunde noch Rohrzucker bis 200 g im Laufe des Tages zu fressen gab (was nicht zu alimentärer Glykosurie führte), oder eine fettreiche Nahrung, bestehend aus 100 g Hundekuchen und 250 g Speck. An jedem Tage wurden bestimmt: Menge des Harns, Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt und aus später zu erörternden Gründen Harnstoff (sowohl nach Pflüger als nach der Methode von Mörner-Sjöqvist) und Ammoniak (nach Folin).

Es ergab sich zunächst, daß, wenn das Tier auf eine bestimmte Nahrung eingestellt war, der Faktor C/N zwar für das

[1]) Die Gesetze usw., S. 412.

[2]) Nach E. Pflüger, dessen Archiv 108, 119 (1905) und 111, 303 (1906).

einzelne Tier hinreichend konstant, aber individuell verschieden ist, z. B. zeigte der eine Hund bei Fütterung mit Hundekuchen den Koeffizienten C/N = 0,720, der andere 0,695. Die Schwankungen um die Mittelzahlen waren nicht größer, als man sie bezüglich des Stickstoffs bei Hunden im Stickstoffgleichgewicht zu sehen gewohnt ist, so daß man ebenso wie von dem Stickstoffgleichgewicht auch von dem Kohlenstoffgleichgewicht ausgehen kann. (Schwankungen unangenehmer, weil unübersichtlicher Art rufen Änderungen in der Temperatur des Aufenthaltsortes hervor, wodurch mir im letzten kalten Winter einige Reihen gestört wurden.)

Da meine Reihen von 10 bis 14tägiger Dauer in ihren Einzelheiten nichts Neues bieten, so möchte ich mich begnügen, hier nur die Resultate mitzuteilen:

A. Fleischfütterung.

In der Reihe	bei Hund					Mittel
1. . . .	A	schwankte der Koeffizient zwischen	0,561	und	0,608	0,593
2. . . .	A	„ „ „ „	0,560	„	0,606	0,589
1. . . .	B	„ „ „ „	0,568	„	0,618	0,606
2. . . .	B	„ „ „ „	0,571	„	0,622	0,615

Gesamtmittel 0,601.

B. Fettfütterung.

In der Reihe	bei Hund					Mittel
1. . . .	A	schwankte der Koeffizient zwischen	0,685	und	0,720	0,705
2. . . .	A	„ „ „ „	0,680	„	0,716	0,691
1. . . .	B	„ „ „ „	0,730	„	0,770	0,755
2. . . .	B	„ „ „ „	0,718	„	0,740	0,725

Gesamtmittel 0,719.

C. Kohlehydratfütterung.

In der Reihe	bei Hund					Mittel
1. . . .	A	schwankte der Koeffizient zwischen	0,780	und	0,820	0,809
2. . . .	A	„ „ „ „	0,750	„	0,796	0,765
1. . . .	B	„ „ „ „	0,751	„	0,804	0,783
2. . . .	B	„ „ „ „	0,722	„	0,770	0,751

Gesamtmittel 0,777.

D. Hunger.

In der Reihe	bei Hund		Tag					Mittel
1. . . .	A	schw. d. Koeffiz. am	3. bis 10.	zwischen	0,750	und	0,778	0,761
2. . . .	A	„ „ „ „	3. „ 10.	„	0,755	„	0,810	0,793
1. . . .	C	„ „ „ „	3. „ 10.	„	0,740	„	0,775	0,753
1. . . .	B	„ „ „ „	3. „ 5.[1]	„	0,725	„	0,730	0,729

Gesamtmittel 0,759.

[1]) Am fünften Tage gestorben.

Die Menge des dysoxydablen Kohlenstoffs und Stickstoffs im Harn.

Schon C. Voit hat vor Jahren darauf aufmerksam gemacht, daß es auf keine Weise gelingt, Werte für das Verhältnis C/N im Harn zu erreichen, die dem Verhältnis dieser beiden Elemente im Harnstoff gleichen (C/N = 0,429). Den niedrigsten beobachteten Wert finden wir bei O. Frank und R. Trommsdorff[1]), die bei Verfütterung von 68 g ausgelaugtem Fleisch pro Körperkilo den Wert bis auf 0,4787 herabdrücken konnten.

Wie oben erwähnt, habe ich in meinen Versuchen auch Harnstoff und Ammoniak bestimmt, also diejenigen beiden Stoffe, die wir als die physiologischen Endprodukte im Harn bezeichnen können. Der folgenden Berechnung sind, um einen Vergleich mit den Angaben in der Literatur zu ermöglichen, die nach Pflügers Methode gefundenen Werte zugrunde gelegt.

Der Harnstoffgehalt (bezogen auf Gesamt-N) schwankte bei

A. Fleischfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	88,1	und	92,3 Proz.	Mittel	90,5 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	88,2	„	92,45 „	„	91,0 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	88,5	„	93,8 „	„	92,0 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	88,0	„	93,6 „	„	89,7 „

Mittel 90,8 Proz.

B. Kohlehydratfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	75,1	und	80,3 Proz.	Mittel	76,4 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	75,8	„	83,1 „	„	79,1 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	75,5	„	83,2 „	„	78,6 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	76,7	„	83,5 „	„	80,2 „

Mittel 78,6 Proz.

C. Fettfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	79,8	und	85,4 Proz.	Mittel	83,2 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	81,7	„	86,3 „	„	85,1 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	80,1	„	84,0 „	„	81,4 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	80,8	„	86,5 „	„	85,0 „

Mittel 83,7 Proz.

D. Hunger.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	76,1	und	81,0 Proz.	Mittel	78,0 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	69,3	„	81,1 „	„	76,0 „
„ „ 1 . .	„ „	C	„	75,2	„	81,4 „	„	79,4 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	79,9	„	88,3 „	„	81,1 „

Mittel 78,6 Proz.

---

[1]) Zeitschr. f. Biologie 43, 258 (1902).

Der **Ammoniakgehalt** (bezogen auf Gesamt-N) schwankte bei

A. Fleischfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	0,41	und	0,55	Proz.	Mittel	0,52 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	0,41	„	0,56	„	„	0,48 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	0,40	„	0,56	„	„	0,50 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	0,41	„	0,53	„	„	0,49 „

Im Mittel 0,50 Proz.

B. Fettfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	0,36	und	0,47	Proz.	Mittel	0,41 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	0,33	„	0,47	„	„	0,38 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	0,33	„	0,41	„	„	0,40 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	0,30	„	0,41	„	„	0,39 „

Im Mittel 0,395 Proz.

C. Kohlehydratfütterung.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	0,27	und	0,36	Proz.	Mittel	0,31 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	0,27	„	0,36	„	„	0,32 „
„ „ 1 . .	„ „	B	„	0,25	„	0,36	„	„	0,30 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	0,25	„	0,42	„	„	0,35 „

Mittel 0,32 Proz.

D. Hunger.

In Reihe 1 . .	bei Hund	A	zwischen	0,30	und	0,35	Proz.	Mittel	0,31 Proz.
„ „ 2 . .	„ „	A	„	0,31	„	0,47	„	„	0,41 „
„ „ 1 . .	„ „	C	„	0,29	„	0,38	„	„	0,35 „
„ „ 2 . .	„ „	B	„	0,30	„	0,43	„	„	0,38 „

Mittel 0,36 Proz.

Die vorstehenden Tabellen zeigen wiederum, daß der Harnstoffgehalt des Harnes beim Hunde nach Fleischfütterung sehr hoch ist, nach Kohlehydratfütterung sehr niedrig, noch erheblich niedriger als bei gemischter Nahrung (82,4 Proz.).

Dadurch, daß in den obigen Versuchsreihen auch gleichzeitig Kohlenstoff und Stickstoff bestimmt wurden, sind wir nun in der Lage zu berechnen, wieviel davon im Harn in Verbindungen erscheint, wie Harnsäure, Xanthinbasen, Kreatinin, Oxyproteïnsäure usw., d. h. Verbindungen, die der Organismus nicht maximal zu oxydieren imstande ist.

Der Kürze halber möchte ich den Kohlenstoff und Stickstoff dieser Verbindungen als **dysoxydablen** Kohlenstoff und Stickstoff bezeichnen. Es ergibt sich dafür das Verhältnis N : C

A. Bei Fleischfütterung:

1 : 2,285	1 : 2,82
1 : 2,337	1 : 2,351

Mittel 1 : 2,449.

B. Bei Fettfütterung:

1 : 2,126 1 : 2,247
1 : 2,23 1 : 2,47
Mittel 1 : 2,268.

C. Bei Kohlehydratfütterung:

1 : 2,07 1 : 2,07
1 : 2,11 1 : 2,09
Mittel 1 : 2,086.

D. Bei Hunger:

1 : 1,97 1 : 1,98
1 : 2,038 1 : 2,06
Mittel 2,011.

Die erhaltenen Zahlen lassen keine wesentliche Differenz bei den verschiedenen Fütterungsarten erkennen. Im allgemeinen zeigte sich, daß, je niedriger die Proportion C/N wird, um so mehr auch dysoxydabler Kohlenstoff im Verhältnis zu dysoxydablem Stickstoff im Harn erscheint:

Art der Nahrung	C/N	Dysoxydabler Kohlenstoff / Dysoxydabler Stickstoff
Fleisch	0,601	2,449
Fett	0,719	2,268
Kohlehydrate	0,777	2,086
Hunger	0,759	2,011

Am interessantesten sind die Zahlen bei Kohlehydratnahrung. Sie zeigen, daß der Quotient C/N bei dieser ein wenig höher ist als bei Fett- oder gemischter Nahrung, ebenso wie auch das Verhältnis von dysoxydablem Kohlenstoff zu demselben Stickstoff gering ist. Aber die Differenzen, namentlich bei dem letzten Wert, sind doch so gering, daß die Zahlen vielfach ineinandergreifen und sie fast als innerhalb der Fehlergrenzen liegend bezeichnet werden müssen.

Durch dieses Verhalten unterscheidet sich der Hund, den man ja als Typus des Fleischfressers bezeichnen kann, deutlich von allen Säugetieren, die gemischte oder kohlehydratreiche Nahrung aufnehmen [1]). Für den Menschen fand F. Tangl [2]) den Quotienten C/N in den Fettreihen zwischen 0,691 und 0,779 schwankend, im Mittel = 0,747, in den Kohlehydratreihen zwischen 0,944 und

[1]) Vgl. F. Tangl, a. a. O.

[2]) A. a. O., S. 258. Vgl. auch L. Langstein und F. Steinitz, Jahrb. f. Kinderheilkunde 61, 94 (1905).

0,981, im Mittel = 0,963. Für den Ochsen fand Kellner[1]) bei reiner Heufütterung in einem Versuch den Quotienten C/N = 2,49, nach Zugabe von Stärke = 3,13, in einem anderen = 2,96 bzw. 3,49. Besonders instruktiv sind endlich die Zahlen, die Meissl[2]) in seiner gründlichen Arbeit über die Entstehung von Fett aus Kohlehydraten für das Schwein gibt. Dasselbe hat im Hungerzustande den Quotienten 0,766; je höher in der Nahrung das Verhältnis N-freier (N_{fr}) zu N-haltiger (N_h) Nahrung war, um so höher stieg auch der Quotient C/N: von 0,568 (bei $N_h : N_{fr} = 1 : 2{,}44$) über 0,971 ($N_h : N_{fr} = 7$) zu 1,11 (bei $N_h : N_{fr} = 11{,}3$ bis 13,7).

Daß die Differenzen tatsächlich von der Ernährungsweise und nicht von anderen Faktoren abhängen, geht am einfachsten daraus hervor, daß die Tierarten im Hungerzustande denselben Quotienten C/N zeigen. So ging er in einem Versuch von mir beim Kaninchen von 1,369 auf 0,762 herab, und alle in der Literatur für beliebige Hungertiere gefundenen Zahlen stimmen ungefähr mit dem Wert überein, den M. Rubner[3]) schon vor 26 Jahren für das hungernde Kaninchen fand: 1 Teil Stickstoff auf 0,7596 Teile Kohlenstoff. Während also im Hungerzustande alle Tiere den gleichen Koeffizienten C/N zeigen, ist dessen Verhalten gegenüber **Kohlehydraten,** je nachdem ob sie gewohnt sind, von Fleisch oder von gemischter Nahrung zu leben, sehr verschieden.

Die Rolle der Kohlehydrate im intermediären Stoffwechsel.

Die im vorstehenden erörterten Tatsachen finden ihre Analogie in dem Einfluß der Kohlehydrate auf einen Vorgang des intermediären Stoffwechsels, in der Bildung der Acetonkörper. Der Mensch reagiert auf Entfernung der Kohlehydrate aus der Nahrung mit der Ausscheidung von Aceton, Acetessigsäure und Oxybuttersäure; ähnlich verhält sich nach den Untersuchungen von J. Baer[4]) der Affe. Auch das Schwein zeigt bei völliger Nahrungsentziehung Acetonurie, während sie der Hund nur bei Phlorizin zeigt, überhaupt von allen Tieren (das Kaninchen vielleicht ausgenommen) sich wohl in dieser Beziehung am meisten refraktär verhält.

Zu erwähnen wären andererseits dabei auch die Beobachtungen von L. Mohr und J. Baer, daß auch öfters Diabetiker, wenn sie

[1]) Landwirtschaftl. Versuchsstationen 44, 257 (1894). Versuche von G. Kühn und dessen Mitarbeitern.
[2]) Zeitschr. f. Biologie 22, 63 (1896).
[3]) Ebenda 17, 228 (1881).
[4]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 54, 153 (1906).

an reine Eiweiß-Fettdiät gewöhnt waren, bei dieser Kost keine Acetonkörper mehr ausschieden.

Hier wären auch neben älteren Erfahrungen über die Ungleichheit der eiweißsparenden Wirkung von Fett und Kohlehydraten, wie man sie auch beim Hund, noch deutlicher beim Menschen sieht, die Versuche von Kayser[1]), Tallqvist[2]), Landergren[3]) und Rosenfeld-Reich[4]) anzuführen, nach denen es unter Umständen unmöglich ist, das Stickstoffgleichgewicht beim Hunde zu erhalten, wenn eine größere Menge Kohlehydrate durch die isodyname Menge Fett ersetzt wird[5]). Auch hier zeigt der Versuch, daß der Organismus langsam eine gewisse Anpassung an die veränderten Ernährungsbedingungen erkennen läßt (G. Rosenfeld).

Man hat in diesen Beobachtungen mit Recht den Beweis dafür gesehen, daß die Kohlehydrate beim Fettstoffwechsel eine Rolle spielen. Das gilt seit den Erfahrungen von Geelmuyden[6]), Magnus-Levy[7]) und anderen auch für die Bildung der bei Kohlehydratmangel auftretenden Acetonkörper, die aus einfachen Fettsäuren entstehen. Da aber diese Körper, speziell das Aceton, nach den Erfahrungen von G. Embden[8]) und seinen Mitarbeitern auch aus Eiweißspaltungsprodukten (Leucin usw.) gebildet werden, müssen wir eine Beteiligung der Kohlehydrate auch beim Eiweißstoffwechsel annehmen[9]).

Einen direkten Beweis für die Beziehungen zwischen Kohlehydrat- und Eiweißstoffwechsel zu führen, ist mir in der folgenden Weise möglich gewesen. Mein Kollege, Herr Dr. K. Stolte, Assistent am hiesigen Institut, hat auf Veranlassung von Herrn Prof. F. Hofmeister Untersuchungen über das Verhalten des „Fruktosamins“, eines Umwandlungsproduktes des Glykosamins, das auch leicht aus Fruktose bei Einwirkung von Ammoniak entsteht, angestellt. Er hat dabei den wichtigen Befund erhoben, daß diese Verbindung zu zwei Körpern abgebaut wird, die mit Ferrosulfat eine rote bzw. blauviolette Färbung geben und

[1]) Zeitschr. f. Biol. 27, 459 (1894).
[2]) Arch. f. Hygiene 41, 177 (1902).
[3]) Skandinav. Archiv 14, 112 (1903).
[4]) Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 29.
[5]) Vgl. hierzu die kritischen Erörterungen von M. Rubner in dessen Buch, S. 409 ff.
[6]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 431 (1897).
[7]) Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. 42, 149 (1899); 45, 389 (1901). Physiol. d. Stoffwechsels, S. 181.
[8]) Diese Beiträge 8.
[9]) Vgl. auch J. Baer u. L. Blum, Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. 55.

von denen der eine 2,5-Pyrazindikarbonsäure ist. Herr Stolte hat ferner festgestellt, daß sie nur Zwischenprodukte sind, von denen das eine bei Verfütterung bis zu 70 Proz. verbrannt wird[1]).

Mir ist nun in drei Fällen bei Kaninchen, deren Stoffwechsel untersucht wurde, der Nachweis gelungen, daß nach intravenöser Injektion von 2 g Glykokoll und 5 g Fruktose die oben erwähnten Verbindungen im Harn auftreten, während sie von diesen Tieren im Normalzustand oder nach Injektion von Glykokoll allein oder von Fruktose allein nicht ausgeschieden wurden. Das Gelingen dieser Synthese ist von individuellen Verhältnissen abhängig, die Mehrzahl der von mir untersuchten Tiere zeigten die Synthese nicht, und auch bei den genannten drei Tieren habe ich sie nur je einmal mit Sicherheit erzielt. Immerhin ist sie in den drei Fällen auch durch meinen Kollegen Dr. Stolte einwandfrei festgestellt, der mir bei der Identifizierung der Substanzen freundschaftlichst mit seinen Erfahrungen beistand und dem ich auch an dieser Stelle danken möchte.

Da der Harn, der mit Eisenvitriol die rote Färbung gab, nach Oxydation den blauen Körper lieferte, habe ich diesen nach der Methode von Dr. Stolte isoliert und durch seine Kristallform, Löslichkeitsverhältnisse (kristallisierendes Ammoniumsalz), Zersetzungspunkt (273°) und Mischprobe mit einem synthetisch gewonnenen Produkte sicher identifiziert als 2,5-Pyrazindikarbonsäure:

$$\begin{array}{ccc} & N & \\ & \diagup \;\; \diagdown\!\!\diagdown & \\ CH & & C.COOH \\ \| & & \| \\ COOH.C & & CH \\ & \diagdown\!\!\diagdown \;\; \diagup & \\ & N & \end{array} \quad + 2\,H_2O.$$

Die Analysen ergaben:

Eine Kristallwasserbestimmung zeigte: 0,169 g verloren 0,030 g H_2O.

Berechnet für $C_6H_4N_2O_4 + 2\,H_2O$:	Gefunden:
17,65 Proz.	17,75 Proz.

Herrn Dr. H. Weil-München verdanke ich folgende Analysen:
0,0804 g gaben 0,1262 g CO_2 und 0,0192 g H_2O.
0,0439 g gaben 6,8 ccm N bei 21° C und 721 mm Hg.

Berechnet für $C_6H_4N_2O_4$:		Gefunden:
C	42,83 Proz.	42,81 Proz.
H	2,40 „	2,67 „
N	16,71 „	17,06 „

[1]) Die ausführliche Mitteilung erfolgt demnächst in diesen Beiträgen.

Beim Hunde habe ich mich bisher von der Synthese der Pyrazindikarbonsäure nicht überzeugen können. Dagegen liegen in der Literatur [1]) Angaben vor, daß bei der Hefegärung von Traubenzucker unzweifelhaft methylierte Pyrazine entstehen, also in ähnlicher Weise synthetisiert werden.

Unsere Auffassung der Stoffwechselvorgänge ist im letzten Jahrzehnt vielfach nur eine rein energetische gewesen. Die spezifische Rolle der verschiedenen Nährstoffe, wie sie sich aus ihrer eigenartigen Konstitution, z. B. der ungleich größeren Reaktionsfähigkeit der Kohlehydrate gegenüber den Fetten, erwarten läßt, trat namentlich betreffs der stickstofffreien Substanzen gegen ihre Bedeutung als Energiequelle ganz in den Hintergrund. Die angeführten Beobachtungen lehren, daß unter bestimmten Verhältnissen ein Ineinandergreifen des Eiweiß- und Kohlehydratabbaus besteht, das zur Entstehung ganz anderer intermediärer Stoffwechselprodukte führt, als wenn die Abbauprodukte beider Reihen für sich allein zum Zerfall kommen.

Vermutlich ist die wichtige Beobachtung von J. Baer und L. Blum [2]), der zufolge Glutarsäurezufuhr bei Phlorizin- und Pankreasdiabetes die Acidose und Zuckerausscheidung herabsetzt, in demselben Sinne zu deuten.

---

[1]) Vgl. (P. Brandes und) C. Stoehr, Journ. f. prakt. Chem. (2) 54, 481.
[2]) Diese Beiträge 10, 80.

XVI.

Zur Kenntnis der Wirkung des proteolytischen Fermentes von Bacillus pyocyaneus.

Von Dr. **Emil Zak.**
Assistenten der vierten medizinischen Abteilung.

Aus dem staatlich serotherapeut. Institut (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt Rudolfstiftung (Vorstand: Dr. E. Freund).

Über den zeitlichen Ablauf der proteolytischen Wirkung von Bakterienfermenten liegen nur spärliche Angaben vor. Einer Anregung des Herrn Privatdozenten Dr. E. P. Pick folgend, habe ich einschlägige Versuche angestellt und teile einige derselben mit, weil sich aus ihnen Beziehungen zu andersartigen fermentativen Prozessen gewinnen lassen.

Bekanntlich besitzen manche Mikroorganismen die Fähigkeit, Eiweißkörper zu spalten; ich erwähne nur, daß in Kulturen von Staphylococcus, Bacillus prodigiosus, von Cholera- und Finkler-Priorschen Spirillen proteolytische Vorgänge nachweisbar sind (Schmailowitsch), daß Proteus vulgaris Caseïn energisch spaltet (Taylor[1]), daß manche Mikroorganismen zwar natives Eiweiß wenig oder gar nicht angreifen, aber deren Spaltungsprodukte noch weiter abzubauen vermögen. Ein solches Verhalten zeigt der Colibacillus, bei welchem Pfaundler[2]) ein dem Erepsin ähnliches Ferment fand.

Über das proteolytische Vermögen mancher hierher gehöriger Fermente liegen eingehende Untersuchungen vor; es gilt dies besonders von der in der Hefe befindlichen Endotryptase und von den Fermenten des Pyocyaneus, welche man nach den Angaben

---

[1]) Taylor, Zeitschr. f. physiol. Chem. 36.
[2]) Pfaundler, Zentralbl. f. Bakteriol. 31.

von Emmerich und Löw[1]) zu isolieren vermag. Die nach der Methode dieser Autoren gewonnene Pyocyanase enthält nebst anderen Fermenten ein proteolytisches Ferment. Nach den Untersuchungen von Eykmann[2]) wirkt das Pyocyaneusferment auf Elastin ein, und zwar vermögen dies auch die keimfreien Filtrate der Kultur.

Die Isolierung von Bakterientoxinen aus einer Kultur durch Filtration der Nährbouillon ließ den Versuch gerechtfertigt erscheinen, in gleicher Weise das proteolytische Ferment einer Kultur samt den anzugreifenden Eiweißkörpern von den Bakterienleibern durch Filtration zu trennen. Man ist so imstande, am keimfreien Filtrat unter antiseptischen Kautelen den Ablauf der Verdauung zu studieren, wie er lediglich durch das an das Nährmedium abgegebene Ferment bedingt wird. Wenn man ferner in gewissen Intervallen aus der wachsenden Kultur Proben entnimmt, filtriert und untersucht, so vermag man sich ein Bild über die proteolytischen Vorgänge in der Kultur selbst zu machen. Ein Vergleich der beiden Prozesse miteinander, einerseits in der Kultur, andererseits im keimfreien Filtrat, schien mir von Interesse zu sein.

In jüngster Zeit benutzten auch Madsen und Walbum[3]) in ähnlicher Weise gewonnene Kulturfiltrate des Bacillus pyocyaneus, um quantitative Studien über die Einwirkung des proteolytischen Bakterienfermentes auf Thymolgelatine anzustellen; ihre Untersuchungen führten zu dem Resultate, daß auch dieses Ferment, wie das Pepsin und Trypsin, bis zu einem gewissen Grade der Schützschen Fermentregel entspricht, indem die Zeit, in welcher die Gelatine verflüssigt wird, der Menge des wirksamen Stoffes umgekehrt proportional ist.

Versuchsanordnung.

Eine größere Menge der zu Kulturzwecken üblichen Bouillon wird mit dem betreffenden Bakterium geimpft und in den Brutschrank eingestellt. In bestimmten Intervallen werden Proben entnommen und durch Pukallsche Tonfilter filtriert. Ein Teil der Probe wurde sofort untersucht, der andere Teil, mit Toluol versetzt, in den Brutschrank gestellt und nach einer bestimmten Zeit ebenfalls untersucht.

---

[1]) Emmerich u. Löw, Zeitschr. f. Hygiene 36.

[2]) Eykmann, Zentralbl. f. Bakteriol. u. Parasitenkunde 1904.

[3]) Zit. nach Sv. Arrhenius, Immunochemie, S. 56. Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig 1907.

Es kam dabei das von E. Zunz[1]) in Anwendung gebrachte und für seine Zwecke modifizierte Verfahren von Baumann und Böhmer in Anwendung, welches in der fraktionierten und quantitativen Abscheidung der Albumosen durch Zinksulfat besteht. Die Kulturflüssigkeit enthält außer Salzen noch Albumosen und deren Derivate, während die Menge von Albumin ganz gering zu veranschlagen ist. Ich hielt mich also genau an die von Zunz angegebenen Vorschriften, nur verzichtete ich auf die Trennung der einzelnen Deuteroalbumosen.

Die alkalische Reaktion von 10 ccm Bakterienfiltrat wurde mit Schwefelsäure neutralisiert, dann mit 0,2 ccm einer bestimmten Schwefelsäure versetzt (1 Volum konzentrierte Schwefelsäure auf 4 Volumen Wasser) und hierauf mit Zinksulfat auf Halbsättigung gebracht. Es fällt sofort ein weißlicher, flockiger Niederschlag aus, der die „primären Albumosen" enthält, eventuell das noch in der Kulturflüssigkeit vorhandene Eiweiß. Ich stellte die mit Zinksulfat halbgesättigte Lösung anfangs für ein paar Stunden in den Brutschrank, dann ließ ich aber in den späteren Versuchen 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen, da sich der weißliche Niederschlag dann gut absetzte und leicht filtrieren ließ. Der Niederschlag wurde mit halbgesättigter, etwas angesäuerter Zinksulfatlösung gewaschen, die vereinigten Filtrate und Waschwässer mit Zinksulfat in Substanz ausgesalzen. (Es empfiehlt sich, diese Lösungen in den Brutschrank zu stellen und erst nach einigen Stunden herauszunehmen; in der Kälte fällt dann das überschüssige Zinksulfat aus.) Nach 24 Stunden haben sich die „Deuteroalbumosen" als eine mehr oder minder braungelbe Masse abgeschieden, welche eigentümlich zähe ist und hartnäckig am Glasstab und an den Wänden des Gefäßes haftet, so daß sie, einmal angetrocknet, manchmal nur durch Auflösen in Wasser und neuerliches Aussalzen quantitativ entfernt und auf das Filter gebracht werden kann. Die Niederschläge werden mit gesättigter Zinksulfatlösung gewaschen und samt den Filtern der N-Bestimmung nach Kjeldahl unterzogen. Das Filtrat der Ganzsättigung bleibt auf weiteren Zinksulfatzusatz klar, gibt Biuretreaktion und enthält somit die echten Peptone, Peptoide und auch noch weiter abgebaute Teile des Eiweißmoleküls, welche keine Biuretreaktion mehr geben. Das Filtrat der Ganzsättigung wird nach neuerlichem Ansäuern durch Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure versetzt, nach ein bis zwei Tagen wird von dem Niederschlag abfiltriert und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure auf noch etwa vorhandene fällbare Substanz geprüft; die mit Phosphorwolframsäure erhaltenen Niederschläge werden mit angesäuertem Wasser gewaschen, und zwar wurde bei den einzelnen Bestimmungen meist eine annähernd gleich große Menge Waschwasser in Anwendung gebracht. Niederschlag und Filtrat wurden dann auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Mit diesem Verfahren erhält man zwei N-Werte, welche nach Hausmann[2]) als Monaminostickstoff (im Filtrat), als Diaminostickstoff (im Niederschlag) bezeichnet werden können. Obwohl die

[1]) Zunz, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 27.
[2]) Hausmann, ebenda 27 und 29.

Zersetzung von phosphorwolframsäurehaltigem Material bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl meist sehr beschwerlich ist, konnte ich doch in gewohnter Weise vorgehen. Die zu verarbeitende Substanz wurde durch ein bis zwei Tage mit einer größeren Menge Schwefelsäure stehen gelassen und dann mit Braunstein oxydiert. In ähnlicher Weise war auch Wetzel[1]) vorgegangen. Die Bestimmungen der Albumosenfällung wurden meist doppelt gemacht und wiesen nur geringe Differenzen auf. Bei den Stickstoffbestimmungen der phosphorwolframsäurehaltigen Substanzen überzeugte ich mich durch einige Doppelbestimmungen, daß keine wesentlichen Fehler entstehen.

Ich lasse zunächst die genaue Mitteilung eines Versuches folgen.

Eine 107 Tage alte Para-Colikultur wird durch ein Tonfilter geschickt; je 10 ccm des Filtrates gelangen zur Doppelbestimmung. Der Rest des Filtrates wird mit Toluol versetzt, gut verschlossen in den Brutschrank gestellt und nach 30 Tagen in gleicher Weise wie bei Beginn des Versuches untersucht.

Tabelle I[2]).

	Halbsättigung			Ganzsättigung		
	1.	2.	Mittelwert	1.	2.	Mittelwert
Vor	0,003 68	0,003 68	0,003 68	0,006 48	—	0,006 48
30 Tage nach	0,003 85	0,004 38	0,004 11	0,006 48	0,0069	0,006 7

	Niederschlag mit Phosphorwolframsäure			Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag		
	1.	2.	Mittelwert	1.	2.	Mittelwert
Vor	0,0091	—	0,0091	0,0211	—	0,0211
30 Tage nach	0,0091	0,0089	0,0090	0,0210	0,0201	0,0205

Die Tabelle zeigt, daß die in der Methodik gelegenen Ungenauigkeiten gering sind, und daß bei dem 30 Tage währenden Versuche keine außerhalb der Fehlergrenze gelegene Zunahme einer Fraktion erfolgt ist. — In gleicher Weise negativ waren die Versuche mit einer 130 Tage alten Pyocyaneus-Kultur und einer 133 Tage alten Coli-Kultur verlaufen. Diese negativen Ergebnisse

[1]) Wetzel, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 29.

[2]) Die mitgeteilten N-Werte entsprechen den bei der Bestimmung erhaltenen Zahlen und beziehen sich daher auf 10 ccm Bakterienfiltrat.

lassen folgende Deutungen zu: Entweder haben die Bakterien kein Ferment produziert oder dasselbe war in seiner Wirksamkeit gehemmt (im „falschen Gleichgewicht", Bredig), möglicherweise durch Anwesenheit von Spaltungsprodukten, welche sich in der alten Kultur angesammelt hatten, oder das Ferment war bei der langen Versuchszeit zerstört worden. Es wurde deshalb der Versuch mit einer ganz frischen Pyocyaneus-Kultur wiederholt.

Verarbeitet wurden diesmal je 25 ccm des Filtrates, und zwar zuerst sterile Bouillon, dann die mit einem Pyocyaneus-Stamm geimpfte Bouillon und zwar 3, 24, 15 × 24, 21 × 24, 35 × 24 Stunden nach der Impfung.

In Tabelle II sind die Werte zusammengestellt. Man erhält auf diese Weise eine Vorstellung von den proteolytischen Vorgängen in der Kultur. — Die mitgeteilten Zahlen entsprechen Prozenten des Gesamtstickstoffs, welcher durch Addition der einzelnen zusammengehörigen Fraktionen erhalten wurde.

Gesamtstickstoffwerte (entsprechend 100 ccm Filtrat).

I.	0,4266 g N
II.	0,4384 „ „
III.	0,4534 „ „
IV.	0,4081 „ „
V.	0,4047 „ „

Aus diesen Zahlen erhellt, daß sich der Gesamtstickstoff der Kultur während des 35 Tage währenden Versuches nicht wesentlich geändert hat.

Tabelle II.

	Sterile Bouillon	Nach der Impfung Stunden				
		3	24	15×24	21×24	35×24
Halbsättigung	17,74	14,552	13,28	4,97	2,94	2,55
Ganzsättigung	27,26	24,589	23,24	8,92	1,56	11,23
Niederschlag mit Phosphorwolframsäure . .	33,93	35,447	38,83	44,08	63,13	48,06
Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	21,02	24,908	24,70	42,02	32,37	37,56

In der beigefügten Kurve (Fig. 1) sind diese Zahlenverhältnisse graphisch dargestellt.

Die durch Zinksulfat ausfällbaren Albumosen betragen etwa 50 Proz. des Gesamtstickstoffs der sterilen Kultur. Nach der Impfung sinkt der Albumosen-N-Wert bis auf ein Minimum am 21. Tage, um von da an zuzunehmen.

Die Albumosen gehören vor der Impfung zu einem Drittel den „primären", zu zwei Dritteln den „Deuteroalbumosen" an. Unter dem Einflusse der wachsenden Pyocyaneus-Kultur erfolgt ein starkes Sinken beider Fraktionen, die Kurve der Deuteroalbumosen fällt sogar am 21. Tage unter den tiefsten Punkt der „primären Albumosen", um sich dann neuerlich um ein beträchtliches Stück zu erheben, während die „primären Albumosen" sich um diese Zeit kaum merklich vermindern.

Die durch Zinksulfat nicht mehr fällbaren Spaltungsprodukte nehmen mit dem Alter der Kultur zu, so daß ihr Anteil am Gesamtstickstoff nach drei Wochen 95,5 Proz. beträgt; in der Folge-

Fig. 1.

$^1/_2$ S. = N der durch Halbsättigung mit $ZnSO_4$ erhaltenen Fraktion.
G. S. = N der durch Ganzsättigung mit $ZnSO_4$ erhaltenen Fraktion.
P. W. N. = N des Phosphorwolframniederschlages.
P. W. F. = N des Filtrats davon.

zeit sinkt ihr Wert um ein geringes. Der Monamino-N erreicht 15 Tage nach der Impfung den höchsten Wert, um dann etwas abzunehmen, der Diamino-N steigt bis zum 21. Tage langsam an und sinkt dann beträchtlich ab.

Während aber bis zum 15. Tage nach der Impfung die Albumosen in der Kultur abnehmen und die übrigen Substanzen, wie es scheint, auf ihre Kosten zunehmen, findet in der dritten und fünften Woche eine beträchtliche Verschiebung der Fraktionen gegeneinander statt. Es fällt da vor allem das Verhalten der „Deuteroalbumosen" auf, deren Zunahme nicht von einer entsprechenden Abnahme der „primären Albumosen" begleitet ist, ein Verhalten,

das man nach den Untersuchungen von E. Zunz erwarten durfte. Die Zunahme der Deuteroalbumosen ist merkwürdigerweise von einer Abnahme der tieferen Spaltungsprodukte des Eiweißmoleküls begleitet, und zwar sind die basischen Körper dabei überwiegender als die sauren Spaltungsprodukte beteiligt. Es liegt die Annahme nahe, daß von der dritten Woche angefangen ein Vorgang sich deutlich bemerkbar gemacht habe, der dem bis dahin stattgehabten wenigstens teilweise entgegengesetzt verläuft. Die auf ein Minimum gesunkenen Albumosen werden nicht mehr angegriffen, statt dessen scheinen tiefere Abbauprodukte zu komplizierteren Verbindungen zusammenzutreten, welche sich gegenüber dem Zinksulfat wie „Deuteroalbumosen" verhalten.

Weshalb sich dieser Vorgang besonders in der dritten Woche manifestiert, entzieht sich der Beurteilung. Es ist nicht wahrscheinlich, daß er um diese Zeit erst eingesetzt habe, ich möchte eher glauben, daß seine Wirkung in diesem Zeitpunkte ihr Optimum gehabt habe, weil der proteolytische Vorgang einerseits genügend weit gediehen und andererseits zu einem gewissen Stillstande gelangt ist. Der Einwand, daß diese Zunahme der Zinksulfatganzsättigungsfraktion durch ein plötzliches Absterben und Auflösen von Bakterienleibern erfolgt sei, läßt sich durch den bloßen Vergleich der Befunde, die am keimfreien Filtrat erhoben wurden, beseitigen.

Von den Filtraten der 3, 24 und 21×24 Stunden alten Kultur wurden Proben mit Toluol versetzt, gut verschlossen in den Brutschrank gestellt und in gewissen Zwischenräumen untersucht.

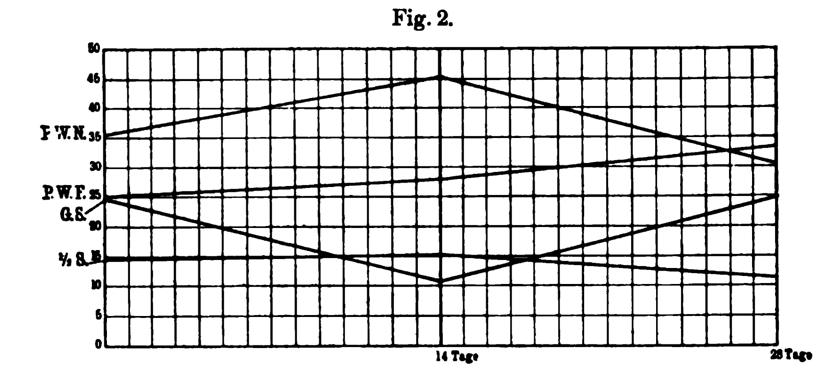
Tabelle III.

	Filtrat der 3 Stunden alten Kultur		
	sofort nach Entnahme	nach 14×24 Stunden	nach 28×24 Stunden
Halbsättigung	14,552	15,28	11,53
Ganzsättigung	24,589	11,18	24,89
Niederschlag mit Phosphorwolframsäure	35,447	45,31	30,37
Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	24,908	28,23	33,21

Wie zu erwarten, zeigte das Filtrat der drei Stunden alten Kultur (vgl. Fig. 2) nur geringe proteolytische Wirkung, wenigstens was die Abnahme der Halbsättigungsalbumosen betrifft. Die Gesamtalbumosen haben nach vier Wochen langer Versuchsdauer den gleichen Stand wie bei Beginn, nachdem die Deuteroalbumosen in der zweiten Woche auf die Hälfte des Anfangswertes gesunken waren. Dieser neuerliche Anstieg der Ganzsättigung ist einerseits von einer geringen

Abnahme der Halbsättigung, aber andererseits von einer deutlichen Abnahme der basischen Körper begleitet. Ähnlich wie in der Kultur manifestiert sich im Filtrat dieser Vorgang in der

Fig. 2.



vierten Woche. Die Kurven, welche diese Verhältnisse darstellen, verlaufen ähnlich den Kurven, die den Befund in der Kultur demonstrieren.

Tabelle IV.

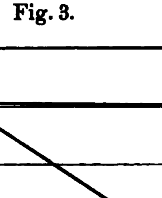
	Filtrat der 24 Stunden alten Kultur		
	sofort nach Entnahme	nach 23 × 24 Stunden	nach 99 × 24 Stunden
Halbsättigung	13,28	7,25	2,48
Ganzsättigung	23,24	41,46	21,87
Niederschlag mit Phosphorwolframsäure	38,83	40,74	39,89
Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	24,70	10,62	35,76

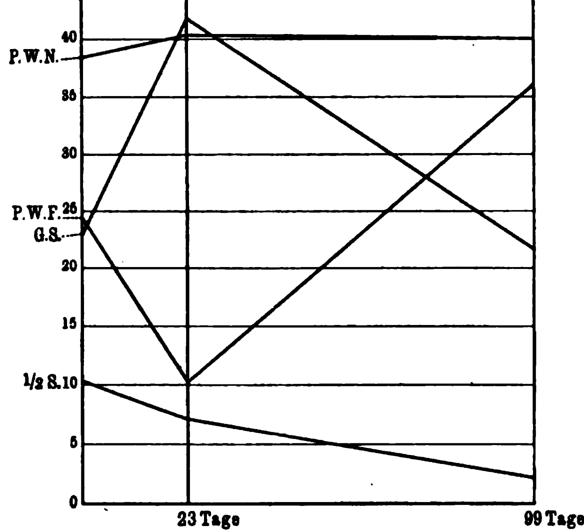
Im Filtrat der 24 Stunden alten Kultur (Tab. IV, Fig. 3) sehen wir, allerdings bei erheblich längerer Versuchsdauer, eine starke Abnahme der „primären Albumosen"; 23 Tage nach Beginn des Versuches steigen die Deuteroalbumosen stark in die Höhe, um nach 99 Tagen wieder zu sinken, so daß sich ihre relative Höhe wenig verändert hat, ebenso wie die der basischen Körper, während die Kurve des Monaminostickstoffs eine starke Schwankung zeigt. Aber auch hier sehen wir die Ganzsättigungsfraktion in ähnlicher Weise wie bei den übrigen Versuchen beteiligt.

Während einerseits aber die Abnahme der primären Albumosen in dem keimfreien Filtrat viel langsamer als in der Kultur verläuft, manifestiert sich im Filtrat die Zunahme in der Ganz-

sättigung früher und deutlicher als in der Kultur; möglicherweise verdecken die stärkeren proteolytischen Vorgänge in dieser zum Teil das Anwachsen der zweiten Fraktion.

Fig. 3.





Bei dem Filtrat der drei Wochen alten Kultur begnügte ich mich, nach 28 und 74 Tagen das Verhalten der Albumosen zu betrachten (vgl. Fig. 4).

Tabelle V.

	Filtrat der 21 × 24 Stunden alten Kultur		
	sofort nach Entnahme	nach 28 × 24 Stunden	nach 77 × 24 Stunden
Halbsättigung	2,94	2,42	1,73
Ganzsättigung	1,56	10,03	8,30
Niederschlag mit Phosphorwolframsäure	63,13	—	—
Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	32,37	—	—

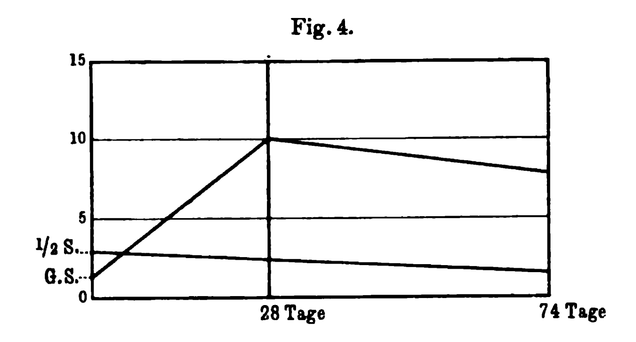
Die bereits auf ein Minimum gesunkenen „primären Albumosen“ werden nur ganz wenig vermindert, während die „Deuteroalbumosen“ in der vierten Woche abermals ein starkes Ansteigen erkennen lassen. Es sei hier auf die Ähnlichkeit auch dieser

Kurven mit denjenigen hingewiesen, welche das Verhalten der Albumosen in der Kultur vom 21. Tage angefangen deutlich machen.

Allen diesen Befunden gemeinsam ist also das eigentümliche Verhalten der „Ganzsättigungsfraktion", welches auch zeitlich eine gewisse Regelmäßigkeit erkennen läßt, indem der Anstieg des N-Wertes in der dritten bis fünften Woche nachweisbar ist. Die Annahme, daß hier eine Umkehrung des Fermentvorganges stattgefunden habe, findet ihre Berechtigung auch in der reversiblen Wirkung anderer Fermente.

Allerdings ist die Deutung einer Synthese durch Fermente nicht immer ganz einfach, wie es das Verhalten des Emulsins und der Maltase bei der Synthese der Maltose und Isomaltose

Fig. 4.



zeigt (Armstrong). Die betreffenden Enzyme bauen stets diejenige Biose auf, die sie nicht zu spalten vermögen. Aber auch im Verlaufe der Wirkung proteolytischer Fermente bilden sich endlich Produkte, die zu der Annahme geführt haben, daß sich eine im Vergleiche mit der abbauenden Wirkung umgekehrte Reaktion bemerkbar mache. Die Möglichkeit, daß es sich hier bloß um Kondensationsprodukte und nicht um einen synthetischen Prozeß handle, ist ebenfalls noch Gegenstand der Diskussion. Dafür würde der Befund von L. Spiegel[1]) sprechen, der am albumosenfreien Pepton bei Gegenwart von 0,1 Teil Formaldehyd Körper von den Eigenschaften primärer und sekundärer Albumosen und albuminartige Substanzen entstehen sah, welche sich bei winterlicher Zimmertemperatur langsamer als bei sommerlicher entwickelten. Hierher gehört auch der von Danilewsky zuerst beobachtete Vorgang der Bildung von eigentümlichen Nieder-

[1]) Spiegel, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 38, 2696.

schlägen in konzentrierten Wittepeptonlösungen unter dem Einflusse von Lab (Okunew) oder Papayotin oder Pepsin (Kurajew[1]), oder natürlichem Magensaft (Lawrow und Salaskin[2]). Für diese hierbei entstandenen Körper bringt Sawjalow[3]) den Ausdruck Plasteïne in Anwendung.

Obschon die entstandenen Produkte ihrer chemischen Individualität nach noch nicht aufgeklärt sind, so haben einige derselben doch Ähnlichkeit mit Körpern vom Eiweißtypus. Einschlägige Untersuchungen wurden von Lawrow[4]) vor kurzer Zeit mitgeteilt.

Auch an überlebenden Organen ließ sich Rückbildung von Albumosen in koagulable Stoffe (Glaessner[5]) beziehungsweise die Bildung von Plasteïnen nachweisen (Grossmann[6]).

Versuche von Abderhalden und Rona[7]), Aminosäuren durch aktivierten Pankreassaft, Darm- oder anderen Organsaft in vitro zu paaren, sind leider negativ verlaufen, während man dem Organismus selbst die Fähigkeit, aus tieferen Spaltungsprodukten durch Synthese höhere Komplexe zu bilden, nach den Versuchen von Loewi[8]), Henriquez und Hansen[9]), Abderhalden und Rona[10]) wohl zuschreiben darf.

Eine auffallende Abnahme des nicht koagulierbaren Stickstoffs nach vorhergegangener Zunahme desselben im Verlaufe der Autolyse konnte schon Schlesinger[11]) feststellen.

Der Gedanke, daß es sich hierbei um eine Rückverwandlung von nichtkoagulierbaren Eiweißderivaten in koagulierbare Körper gehandelt habe, ist nicht von der Hand zu weisen. Für diese Annahme spricht, daß es Sawjalow[12]) gelang, koagulierbare Plasteïne darzustellen. Auch muß der Befund von Knapp[13]) erwähnt werden, der bei einem Versuche mit Staphylokokken-Eiter eine Zunahme der koagulierbaren Substanzen des Nährmediums fand.

---

[1]) Kurajew, Diese Beiträge 1 und 4.
[2]) Lawrow u. Salaskin, Zeitschr. f. physiolog. Chem. 36.
[3]) Sawjalow, Pflügers Archiv 85.
[4]) Lawrow, ebenda 51.
[5]) Glaessner, Diese Beiträge 1.
[6]) Grossmann, Diese Beiträge 4 und 7.
[7]) Abderhalden und Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 48.
[8]) Loewi, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 48.
[9]) Henriquez und Hansen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 43.
[10]) Abderhalden und Rona, ebenda 44.
[11]) Schlesinger, Diese Beiträge 4.
[12]) Sawjalow, Zentralbl. f. Physiol. 16.
[13]) Knapp, Zeitschr. f. Heilkunde 23.

In allerjüngster Zeit hat Taylor[1]) bei der Aufspaltung des Protamins durch Trypsin in Aminosäuren auch einen dem Spaltungsvorgang entgegengesetzt verlaufenden Kondensationsprozeß beobachtet, durch den aus etwa 400 g Aminosäuren etwa 2 g Protamin in fünf Monaten entstanden waren. Der Verlauf des Prozesses kann durch die Gleichgewichtsformel

$$\text{Protamin} + H_2O \rightleftarrows \text{Aminosäuren}$$

dargestellt werden, wobei das Trypsin die Reaktion in jeder Richtung beschleunigt.

Wir sehen, daß die mitgeteilten Befunde gewisse Analogien in der Wirkungsweise anderer Fermente besitzen. Der von uns untersuchte Pyocyaneus-Stamm läßt also neben einer Albumosen spaltenden Wirkung noch einen synthetischen Vorgang erkennen, und zwar sowohl in der geimpften Bouillon wie auch in dem keimfreien Filtrat.

[1]) Taylor, A. E., Univ. of. California Public. Path. 1, 343, Fbr. 1907; zitiert nach Biochem. Zentralbl. 6 (1907).

Wien, April 1907.

XVII.

Über die Lipoidlöslichkeit des Ricinusöles.

Von Wilhelm Filehne.

Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Breslau.

Die abführende Wirkung des Ricinusöles bzw. der Ricinolsäure könnte zusammenhängen mit einer für den Darm bestehenden Schwierigkeit, diese Fettsubstanzen zu resorbieren, während die größere Leichtigkeit, mit der er beispielsweise Olivenöl und Ölsäure resorbiert, sowohl die Ausnutzung des Nährwertes dieser Stoffe als das Fehlen der Abführwirkung bei Gaben bis zu 50 g (für den Menschen) und darüber erklären könnte.

Wenn es nun gilt, diesen Gedanken experimentell zu prüfen, so steigen sofort Bedenken und Schwierigkeiten auf: es müßte doch die Resorbierbarkeit der beiderseitigen Stoffe ceteris paribus geprüft werden, d. h. entweder ist das Olivenöl bei genau gleichstarker (Abführ-) Peristaltik des Darmes, wie solche vom Ricinusöl erzeugt wird, der Resorption auszusetzen, oder es ist umgekehrt Ricinusöl bei gleich ruhiger Peristaltik, wie wenn nur Olivenöl gegeben wäre — also ohne abführende Wirkung —, im Darm zu belassen. Der ersteren Indikation so zu genügen, daß alles andere wirklich gleich bliebe, dürfte unausführbar sein. Dagegen könnte der zweiten Anforderung am unverletzten Tiere allenfalls dadurch entsprochen werden, daß man sowohl für Olivenöl als für Ricinusöl mit Därmen experimentierte, die durch Opium völlig zur Ruhe gebracht sind.

Weniger mühsam, reinlicher in der Arbeit und unzweideutiger in etwaigen Resultaten könnte die angeregte Frage vielleicht an isolierten Darmschlingen — mit und ohne natürlichen Zufluß von Pankreassaft und Galle — in Angriff zu nehmen sein.

Die von mir an Katzen in dieser Richtung angestellten, mannigfach variierten Versuche sind trotz schonendster Technik sämtlich resultatlos ausgegangen, indem der Darm auch vom Olivenöl selbst

nach 24 Stunden nichts resorbiert hatte. Offenbar macht der unvermeidliche operative Eingriff die Ölresorption unmöglich. Bevor ich nun zu Versuchen am opiumbehandelten Darme schritt, die ja doch ein wirklich eindeutiges Resultat auch nicht geben konnten, verfolgte ich nachstehende Idee.

Es liegt nahe anzunehmen, daß für unsere Frage quantitative Ermittelungen über Lipoidlöslichkeit von nährenden Neutralfetten, Ölsäure und der nicht abführenden Pseudoricinolsäure auf der einen Seite und Ricinusöl und Ricinolsäure auf der anderen, von Bedeutung sein würden [1]). Verhehlen dürfte man sich allerdings nicht, daß aus den so gefundenen Zahlen unmittelbare Schlüsse bezüglich des physiologischen Vorganges der Resorption der Nahrungsfette oder der Abführwirkung des Ricinusöles sich nicht ergeben können. Des ferneren wirkt folgende Erwägung fast abschreckend: Welches Lipoid soll man wählen? Und mit welchem Rechte wollten wir die gefundenen Zahlen verwerten für die Vorgänge in den verschiedenen Zellen des Darms, innerhalb der Lymphe usw., wo doch im Organismus sicherlich sehr viele und verschiedene Lipoide vorhanden sind und deshalb die Öle sich in nicht zu übersehenden Verhältnissen auf die einzelnen Lipoide verteilen werden. Aber ich meinte: besser wenig als gar nichts. Irgend wie muß angefangen werden. So übergebe ich denn das, was ich untersucht habe, als Vorarbeit für diejenigen, die es bei ihren Arbeiten verwerten können.

Will man nun über Löslichkeit von Fetten in Lipoiden experimentieren, so darf man selbst auch nur für eine Vorprobe das käufliche Lecithin nicht anwenden, — denn dieses löst weder merkbar Öle, noch löst es sich in ihnen. Dagegen sind reine Cholesterinester oder auch schon das käufliche Lanolin und der Adeps lanae verwertbar, um die Grenzen der Löslichkeit anschaulich zu machen: man erwärme z. B. Olivenöl bis auf 60° C, trage soviel von Lanolin oder einem reinen Cholesterinester ein, wie sich eben noch lösen will und lasse dann diese ölige Lösung auf 37° abkühlen; alsdann scheidet sich der Ester bzw. das Lanolin teilweise aus, und man hat zwei Phasen: erstens Öl, das für 37° C mit dem Ester gesättigt ist, und zweitens Ester, der für 37° C mit Öl gesättigt ist.

Obschon nun unsere Frage sich nur auf die Lipoidlöslichkeit jener Öle usw. und nicht auf die Löslichkeit der Lipoide in Ölen usw.

---

[1]) Vgl. besonders die Arbb. von R. Hoeber und die neuerdings erfolgte Publikation von M. Katzenellenbogen, Pflügers Arch. **114**, 522.

bezieht, so habe ich doch letztere, schon der Kontrolle wegen, ebenfalls bestimmt.

Mit Rücksicht auf die Spaltungsvorgänge im Darm habe ich nicht bloß für die Neutralfette, sondern auch für ihre Säuren die betreffenden Zahlen festgestellt.

Die auf ihre Lipoidlöslichkeit zu prüfenden Stoffe hatten sämtlich bei Zimmertemperatur eine ölige Beschaffenheit, es waren: Olivenöl, Ölsäure (aus Olivenöl von E. Merck, Darmstadt), Ricinusöl, Ricinolsäure (Dr. H. Koenig, Leipzig-Plagwitz), Pseudoricinolsäure (nach H. Meyers [1]) Vorschrift von uns dargestellt), Crotonolsäure (E. Merck). Deswegen durfte für die Untersuchung irgend ein bei Zimmertemperatur festes Lipoid um so mehr wünschenswert erscheinen, als ich ursprünglich die Lipoidlöslichkeit der Öle dadurch quantitativ bestimmen wollte, daß ich die Schmelzpunktsänderung feststellte, die ein bestimmtes Lipoid durch Sättigung mit Öl usw. erführe. So wählte ich den Stearinsäureester des Cholesterins [2]), der bei 79,6° C schmelzend, sich experimentell als bequem erwies. Er war auf meine Veranlassung von E. Merck, Darmstadt, dargestellt worden.

Bekanntlich verändert die Auflösung einer flüssigen Substanz in einer festen Substanz den Schmelzpunkt der letzteren. Wenn wir daher, beispielsweise, zu geschmolzenen Proben unseres Esters (Schmelzpunkt 79,6° C) je $2^1/_2$, 5, 10 und 20 Proz. Olivenöl oder Ölsäure zufügten, gut umrührten, die gewonnene Lösung erstarren ließen und sie nach 24 bis 48 Stunden Pause (die erforderlich ist, um einen gleichbleibenden Schmelzpunkt zu gewinnen) auf ihre Schmelzpunktsänderungen prüfen, so ergab sich selbstverständlich eine um so größere Erniedrigung des ursprünglichen Schmelzpunktes des Esters, je mehr von der öligen Substanz in ihm gelöst war. So erhielten wir vier Punkte der fraglichen Schmelzpunktkurve und konnten aus den gefundenen Zahlen für drei Strecken

---

[1]) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 28, 147.

[2]) Es lag ja nahe, für diese Versuche das billigere Lanolin zu wählen. Ich mußte die Verwendung dieses Stoffes indes sehr bald aufgeben, da das Lanolin nicht nur in den verschiedenen Lieferungen recht beträchtliche Abweichungen des Schmelzpunktes zeigte, sondern auch in verschiedenen Stichproben, die der einzelnen Lieferung entnommen wurden, Abweichungen bis zu 5° C gab. Und selbst wenn eine Quantität von z. B. 20 g geschmolzen, energisch umgerührt und unter Umrühren der Erkaltung und Erstarrung überlassen worden war, so gaben dennoch die verschiedenen Stichproben verschiede Schmelztemperaturen: — offenbar findet vor der Erstarrung eine Schlierenbildung ungleichartigen Materials in dem „Lanolin“ statt, das ja doch ein Gemenge verschiedener Körper ist.

der Kurve die Schmelzpunktserniedrigung pro ein Prozent Ölgehalt berechnen. Es ergab sich, daß auf allen drei Strecken der (Schmelzpunktserniedrigungs-) Wert für je ein Prozent im wesentlichen derselbe war, daß also die Kurve annähernd eine gerade Linie darstellt. Indem wir uns sodann auf weiter unten genauer zu meldende Weise ein Quantum mit Öl (und Ölsäure) gesättigten Esters herrichteten und dessen Schmelzpunkt ermittelten, konnten wir den Ölprozentgehalt der untersuchten Probe aus der jetzt beobachteten Schmelzpunktserniedrigung und der vorher für je ein Prozent ermittelten Erniedrigung berechnen. Nachdem dies geschehen, wurde zur Sicherstellung des berechneten Prozentgehaltes in einer Probe des Esters diese berechnete Menge der öligen Substanz tatsächlich aufgelöst und nach der nötigen Ruhe auf ihren Schmelzpunkt geprüft.

Es möge noch erwähnt werden, daß man bei einiger Übung schon während der Schmelzpunktsbestimmung erkennt, wenn der Sättigungspunkt des Esters überschritten ist; während sich unterhalb dieser Grenze ein ganz bestimmtes, stets annähernd gleiches Temperatur-Intervall zwischen Beginn des Erweichens und dem Klarwerden der geschmolzenen Masse zeigt, wird oberhalb der Aufnahmefähigkeit das Intervall sehr viel größer (es löst sich dann allmählich der ölhaltige Ester in dem überschüssigen Öle).

Die Schmelzpunktsbestimmung des Esters nach Zufügung bestimmter steigender Mengen Öles oder nach Sättigung mit Öl gab indessen, wie sich zeigen wird, nicht so befriedigende Resultate, daß ich nicht zur Ermittelung der Lipoidlöslichkeit der Öle usw. noch anderweitige, womöglich bessere oder zum mindesten doch kontrollierende Methoden glaubte anwenden zu sollen. Der Schmelzpunktsbestimmung hängt bei Fettgemischen etwas unsicheres, etwas stark subjektives an; diese Gemische schmelzen nicht bei einer genau angebbaren Temperatur, vielmehr beginnt zunächst ein „Erweichen“, das — beispielsweise — trotz vorsichtig langsamen Erwärmens für dieselbe Mischung in fünf Bestimmungen fünf verschiedene zwischen 70,2° und 71,0° liegende Werte gab, dann nach weiterem Erwärmen, findet sich protokolliert: „Schmelzen“ und schließlich „Klarwerden“. Vom „Erweichen“ bis zum „Klarwerden“ steigt die Quecksilbersäule im Thermometer um etwa 3° C. Und selbst für „Klarwerden“ sind für dieselben Mischungen Angaben protokolliert, die bis zu 0,6° C von einander abweichen.

Deshalb sah ich mich noch nach anderen Methoden um, die Lipoidlöslichkeit unserer Fette zu bestimmen. Zu diesem Zwecke

wurde zunächst das spezifische Gewicht der gesättigten Lösungen pyknometrisch festgestellt. Das pyknometrisch gemessene spezifische Gewicht unseres Esters betrug 0,9770. Die spezifischen Gewichte der fraglichen Öle waren glücklicherweise — bis auf eine Ausnahme — von jenem genügend abweichend: zwischen 0,871 und 0,9560. Schon aus diesen Zahlen konnte wohl der Ölgehalt der gesättigten Lösungen — also die Lipoidlöslichkeit der Öle — berechnet werden, da ihr spezifisches Gewicht bekannt war. Genauer wurden die Ergebnisse durch zwei Kontrollen: erstens waren vorher empirisch die Änderungen des spezifischen Gewichts festgestellt worden, die der Ester nach Beimengung jener kleinen steigenden Ölmengen aufwies, die oben bei der Schmelzpunktmethode erwähnt sind, — wodurch einige Punkte der Kurve auch hier gesichert und die Änderungen des spezifischen Gewichts pro ein Prozent Beimengung ausgedrückt werden konnten. Sodann wurde noch, zur Sicherstellung der für die gesättigte Lösung berechneten Prozentzahl, einem Quantum des Esters das betreffende Öl usw. in dem berechneten Prozentverhältnisse tatsächlich zugesetzt und auch von dieser Lösung das spezifische Gewicht bestimmt. Die Abweichungen der hier gefundenen Werte von den für die gesättigten Lösungen festgestellten waren gering.

Bei der Bestimmung der Aufnahmefähigkeit unseres Esters für Crotonolsäure mittels Feststellung des spezifischen Gewichts des gesättigten Gemisches versagte diese Methode, da die Aufnahmefähigkeit offenbar gering ist und der Unterschied im spezifischen Gewicht des Esters und der Crotonolsäure nicht groß genug ist, um eine Bestimmung kleiner Mengen des aufgenommenen öligen Körpers zuzulassen. Der Ester hat ein spezifisches Gewicht von 0,9770, die Crotonolsäure von 0,989; das gesättigte Gemisch hatte ein spezifisches Gewicht von 0,9778. Hier müssen die Ergebnisse der Schmelzpunktsbestimmungen benutzt werden. Bei diesen hatte sich gezeigt, daß der Gehalt der gesättigten Mischung bei $4^1/_2$ Proz. bis 5 Proz. liegt. Eine Mischung des Esters mit 5 Proz. Crotonolsäure ergab ein spezifisches Gewicht von 0,9779 — was mit dem vorhergemeldeten spezifischen Gewicht des „gesättigten“ Gemisches (0,9778) gut übereinstimmt, aber doch erst in der vierten Dezimale vom spezif. Gewicht des reinen Esters (0,9770) abweicht —, also für sich allein zur Bestimmung des Prozentgehaltes von Crotonolsäure nicht verwertet werden kann.

Der größeren Sicherheit wegen habe ich zur Ermittelung der Lipoidlöslichkeit unserer Öle auch die Methode der von Hüblschen

Jodzahlbestimmung [1]) benutzt. Bevor ich indes hierüber Bericht erstatte, will ich eine Übersicht der bis hierher gewonnenen Resultate geben. Und zwar sollen zuerst angeführt werden die Löslichkeitsverhältnisse des Esters in den öligen Stoffen, obschon in biologischer Beziehung eigentlich umgekehrt ausschließlich die Lipoidlöslichkeit der öligen Stoffe interessiert. Indes ist die Löslichkeit unseres Lipoids in Ölen so unmittelbar und einfach zu bestimmen, und die Irrtumsquellen bei diesen Bestimmungen sind so viel übersichtlicher, daß es wohl um so mehr nützlich erscheinen dürfte, diese Löslichkeit des Esters in den Ölen voranzustellen, als ja doch zwischen den beiderseitigen Löslichkeitsverhältnissen eine nahe Beziehung existieren muß.

I. Löslichkeit des Lipoids (Stearinsäureester des Cholesterins) bei 37° C in:

Olivenöl . . .	3,35 Proz.	Ricinolsäure . . .	0,33 Proz.
Ölsäure . . .	4,11 „	Pseudoricinolsäure .	0,85 „
Ricinusöl . . .	0,26 „	Crotonolsäure . . .	0,87 „

II. Im Ester lösen sich (bei Zimmertemperatur) im Maximum:

	A. Aus dem spez. Gew. ermittelt Proz.	B. Nach der Schmelzpunktsbestimmung Proz.
Olivenöl	25,5	33,8
Ölsäure	37,0	40,0
Ricinusöl	5,0	1,85
Ricinolsäure	20,0	16,0
Pseudoricinolsäure	10,0	12,0
Crotonolsäure	(5,0)	5,0

Wie man sieht, liefert die Schmelzpunktsbestimmungsmethode als Kontrollmethode einigermaßen Brauchbares.

Für die zur Bestimmung der Jodzahl angestellten Versuche war das Lipoidölmaterial ganz so wie in den oben beschriebenen Versuchsreihen vorbereitet. Um öl-„gesättigte“ Esterproben zu gewinnen, wurden auch hier gleiche Mengen von Ester und Öl bei eben ausreichender Erwärmung (auf dem Wasserbade) zusammengeschmolzen und verrührt, unter Umrühren erkalten gelassen und zwischen Fließpapier, bei häufigem Wechsel des Papiers,

[1]) Benedikt-Ulzer, Analyse der Fette und Wachsarten, Berlin 1903 (4. Aufl.), S. 195.

abgepreßt, um das überschüssige Öl zu entfernen. Nach je 2, 8 und 14 Tagen abpressen wurden Proben zur Analyse entnommen. Die Jodzahlen unseres Materials waren als Durchschnitt mehrerer gut übereinstimmender Bestimmungen folgende:

Cholesterin-Stearinsäure-Ester	32,2	Ricinusöl	86,2
Olivenöl	86,7	Ricinolsäure	84,4
Ölsäure	84,2	Pseudoricinolsäure	89,4

Wie man sieht, liegen die Zahlenwerte, einerseits des Esters (32,2) und andererseits der Öle (zwischen 84,2 und 89,4), so weit auseinander, daß eine Berechnung der Lipoidlöslichkeit gut ausführbar ist. Es sei α die Jodzahl des Esters und β jeweils die des Öles, m das Gewicht der untersuchten Gemischprobe, γ die für diese Probe gefundene Jodzahl, so haben wir die beiden Gleichungen

$$x + y = m$$
$$\alpha x + \beta y = \gamma,$$

in denen x das Gewicht des Esteranteils und y das des Ölanteils in der Probe sein soll. Hieraus berechnet sich

$$y = \frac{\gamma - \alpha m}{\beta - \alpha},$$

unter der Voraussetzung, daß die jodaddierenden doppelten Bindungen sich nicht durch das Zusammenschmelzen und die Prozeduren der v. Hüblschen Bestimmungsmethode (Auflösen in Chloroform usw.) geändert haben.

Für die gesättigten Proben fanden wir die folgenden Prozentzahlen:

Tabelle III.

	Nach 2tägigem Abpressen Proz.	Nach 8tägigem Abpressen Proz.	Nach 14tägigem Abpressen Proz.
Olivenöl	30,0; —	10,0; 13,0	11,4; 9,2
Ölsäure	16,8; 16,0	14,0; 20,0	6,9; 9,1
Ricinusöl	40,4; —	27,3; —	27,6; 27,5
Ricinolsäure	21,0; 19,0	24,0; —	30,7; 25,3
Pseudoricinolsäure	16,8; 15,3	16,6; 15,9	0 —

Sehen wir zunächst von dem befremdlichen Befunde ab, daß nach 14tägigem Abpressen die mit der Pseudoricinolsäure „gesättigte“ Probe gar nichts mehr von ihr enthielt, während nach 2- und 8tägigem Abpressen in vier Bestimmungen zwischen 15,3

und 16,8 Proz. gefunden wurde. Die übrigen Zahlen sind von der Art, daß wir die nach 14tägigem Pressen gewonnenen als benutzbar ansehen dürfen. Wir haben nun, wie in den beiden ersten Versuchsreihen, uns zur Kontrolle Proben hergestellt, die tatsächlich die aus Tab. III sich ergebenden Mengen von Öl usw. enthielten — also für Olivenöl 10, Ölsäure 8, Ricinusöl 27, Ricinolsäure 25 Proz. Für die Pseudoricinolsäure nahmen wir 16 Proz., wie nach 2 und 8 Tagen Pressung gefunden war. Mit jedem Materiale wurden 24 Stunden nach der Herstellung drei Bestimmungen der Jodzahl gemacht. Die folgende Tabelle gibt den aus diesen Jodzahlen berechneten Prozentgehalt.

Tabelle IV.

Benutzte Mischung	Berechneter Gehalt		
	Proz.	Proz.	Proz.
10 proz. Olivenöl	— 7,0	— 9,8	+ 5,4
8 „ Ölsäure	— 2,5	+ 7,9	+ 0,3
27 „ Ricinusöl	+ 37,8	+ 19,7	+ 19,5
25 „ Ricinolsäure	+ 9,25	+ 13,9	+ 13,8
16 „ Pseudoricinolsäure	± 0	— 2,0	+ 2,0

Durch diese überraschenden Befunde wird man zu der Annahme gedrängt, daß namentlich bei Pseudoricinolsäure, aber auch bei Olivenöl und Ölsäure jodbindende Affinitäten in unseren Gemischen verschwunden sind. Dagegen sind bei den Ricinusölgemischen fast alle, bei der Ricinolsäure wenigstens etwa die Hälfte dieser Affinitäten unversehrt.

Unter diesen Umständen hat es keinen Sinn, aus den Zahlen der Tab. III die Lipoidlöslichkeit unserer öligen Stoffe berechnen zu wollen. Die v. Hüblsche Methode ist anscheinend in unserem Falle nicht anwendbar.

Dagegen scheint es biologisch von Bedeutung zu sein, daß — wie wir wohl annehmen dürfen — bei der Lösung von Fetten in Lipoiden chemische Veränderungen vorkommen können, und ferner, daß diese Veränderungen sich gerade nur bei den Nahrungsfetten und der nicht abführenden Pseudoricinolsäure finden, während die abführenden Stoffe, Ricinusöl und Ricinolsäure, derartige Umsetzungen nicht — oder doch wesentlich weniger — zeigen. — Diesem Gedanken experimentell nachzugehen, liegt außerhalb meines Arbeitsfeldes.

Angesichts dieser Erfahrungen mit der Jodzahlmethode ist es nun wohl auch mißlich, die für sich allein ja befriedigenden Ergebnisse der beiden ersten Versuchsreihen (Bestimmung des Schmelzpunktes und des spezifischen Gewichtes) als genügend sicher anzusehen, bevor die chemischen Vorgänge in den Lipoidölgemischen aufgeklärt sind. Es genügt mir, die Resultate meiner Bemühungen gebracht zu haben.

Methodik und Protokolle [1]).

Schmelzpunktbestimmung. Die in den unten angegebenen Verhältnissen abgewogenen Mengen Ester und Öl bzw. Ölsäure wurden auf dem Wasserbade unter Umrühren verschmolzen und gleichfalls unter Umrühren erkalten gelassen. Die so erhaltene Masse wurde möglichst fein zerrieben und in Schmelzpunktröhrchen gefüllt. Die Bestimmungen geschahen mit einem in $^1/_{10}$° geteilten Normalthermometer im Schwefelsäurebade in einem Rundkolben mit langem Halse (Kjeldahlkolben).

Tabelle V.

Der Schmelzpunkt des reinen Esters liegt bei 79,4 bis 79,8°, im Mittel 79,6°. Bei den einzelnen Proben wurden die Temperaturen des Erweichens, Schmelzens und Klarwerdens beobachtet. Die beigefügten Bruchzahlen geben die Mengen der zugesetzten Öle bzw. Fettsäuren im Verhältnis zur Menge des Esters an.

Olivenöl.

	$^1/_5$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	Im Mittel: $^1/_5$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$
Erweichen	?	75,2; 76,0	76,3; 75,8	—	—	—
Schmelzen	76,2	77,2; 78,1	77,4; 76,9	76,2	77,7	77,7
Klarwerden . . .	78,6	78,5; 79,0	79,1; 79,2	78,6	78,8	79,2

(Im Folgenden sind die drei Stadien: Erweichen, Schmelzen, Klarwerden nicht mehr namhaft gemacht; der Leser wolle die drei vertikal untereinander befindlichen Zahlen so deuten.)

Ricinusöl.

$^1/_{40}$	$^1/_{80}$	Im Mittel: $^1/_{40}$	$^1/_{80}$
76,1; 75,6	76,8; 75,6	—	—
78,2; 77,6	77,4; 77,1	77,9	77,2
79,7; 79,4	79,5; 79,2	79,6	79,4

Ölsäure.

$^1/_5$	$^1/_{10}$	Im Mittel: $^1/_5$	$^1/_{10}$
71,5; —	75,4; 74,1	—	—
73,2; —	76,1; 75,2	—	76,6
75,6; —	78,1; 77,6	—	77,9

[1]) Den experimentell-chemischen Teil habe ich durch den Institutsassistenten Herrn Dr. phil. G. Klose ausführen lassen.

Ricinolsäure.

1/20	1/40	Im Mittel: 1/20	1/40
76,1; 75,8	77,1; 76,6	—	—
77,2; 76,6	77,9; 77,8	76,9	77,9
78,8; 78,4	79,2; 79,4	78,6	79,3

Crotonolsäure.

1/20	1/40	Im Mittel: 1/20	1/40
75,3; 75,6	75,9; 76,0	—	—
76,5; 76,7	77,2; 76,8	76,6	77,5
79,1; 79,3	79,2; 79,0	79,2	79,1

Pseudoricinolsäure.

1/10	1/20	Im Mittel: 1/10	1/20
74,9; 75,0	75,7; 75,1	—	—
76,2; 75,8	77,0; 77,4	76,0	77,2
77,1; 76,8	78,3; 78,7	77,0	78,5

Die mit Öl bzw. Ölsäure gesättigten Esterproben wurden in derselben Weise vorbereitet, und zwar derart, daß Ester und beigemengte Substanz im Verhältnis 1:1 vorhanden waren. Nach dem Erkalten wurde dann solange zwischen Filtrierpapier unter oftmaliger Erneuerung des letzteren unter Drucken bis zu 20 kg abgepreßt, bis sich keine Änderung im Schmelzpunkte mehr ergab.

Tabelle VI.

	Im Mittel	Proz.	Gegenprobe
Olivenöl			
73,4; 73,0	—	—	74,1; 74,5
74,6; 74,1	74,4	—	75,6; 75,8
76,9; 76,9	76,9	33,8	76,7; 77,0
Ricinusöl			
78,2; 77,9	—	—	77,1; 77,6
78,8; 78,6	78,7	—	78,2; 78,5
79,2; 79,3	79,3	1,85	79,1; 79,0
Ölsäure			
70,5; 70,2	—	—	71,0; 70,6
72,0; 71,9	72,0	—	72,4; 72,0
72,5; 73,1	72,8	40	72,8; 73,0

Ricinolsäure.

Die Bestimmungen gaben wechselnde und widersprechende und, wie sich später zeigte, stets zu niedrige Werte, ohne daß wir die Gründe für die Widerspenstigkeit des Materials aufzuklären vermochten; wir verzichten auf die Wiedergabe eines Versuchsbeispiels. Dagegen geben wir die Schmelzpunktsbestimmungen mit Ricinolsäure, die gewonnen wurden, nachdem wir aus der Bestimmung des spez. Gew. einer mit Ricinolsäure gesättigten Esterprobe einen Gehalt von 20 Proz. ermittelt hatten.

Eine neue tatsächlich zu 19 bis 20 Proz. mit Ricinolsäure versetzte Esterprobe lieferte folgende Zahlen:

73,4; 73,8	Im Mittel:	73,6
75,2; 75,1		75,2
76,7; 76,9		76,8

Nun hatte — s. vorige Versuchsreihe — $^1/_{20}$ Ricinolsäure Schmelzpunkt 78° C ergeben. Hieraus berechnet sich der tatsächlich 19 bis 20 Proz. betragende Gehalt unserer Probe auf 16 Proz. — also wiederum zu niedrig.

	Im Mittel	Proz.	Gegenprobe
Crotonolsäure			
75,1; 75,6	—	—	75,1; 75,6
76,9; 76,8	76,9	—	76,9; 76,8
79,3; 79,2	79,3	5	79,3; 79,2
Pseudoricinolsäure			
74,4; 75,1	—	—	74,1; 74,9
75,0; 76,2	75,6	—	75,2; 76,3
76,0; 76,6	76,3	12	76,2; 77,0

Die in der dritten Reihe angeführten Prozentzahlen berechnen sich unter Zugrundelegung der Tab. V. Die „Gegenprobe“ wurde dann mit Ester ausgeführt, dem in der Tat 33,8 usw. Proz. der zu untersuchenden Substanz beigemengt waren, um uns von der Richtigkeit und Genauigkeit der in der ersten Senkrechten angeführten Zahlen zu überzeugen. — —

Für die Bestimmung des spez. Gew. wurden die Proben in gleicher Weise vorbereitet, darauf in Pyknometer gefüllt, im Trockenschrank bei 80° geschmolzen und auf Zimmertemperatur darin abgekühlt. Es gab durchweg klare Schmelzen ohne jede Einschlüsse. Beim Erstarren bildeten sich Risse und Spalten von der Oberfläche aus. Durch vorsichtiges Einbringen von Wasser mittelst Kapillarpipetten und häufiges Klopfen wurden nach und nach alle Luftbläschen entfernt; die Wägungen wurden so oft wiederholt, bis keine Änderung des spez. Gew. mehr eintrat.

Tabelle VII.

(Temp. 24°.) Spez. Gew. des Esters: 0,977 (im Mittel).

	Spez. Gew. des Öles bzw. der Säure	Spez. Gew. des Gemenges	Spez. Gew. des gesätt. Esters	Proz.	Gegenprobe (spez. Gew.)
Olivenöl . . .	0,871	($^1/_{10}$) 0,9680	0,9545	25,5	0,9553
Ricinusöl . . .	0,961	{[($^1/_{40}$) 0,980] [($^1/_{80}$) 0,978]}	0,9760	5,0	0,9759
Ölsäure	0,923	($^1/_{10}$) 0,974	0,9663	37,0	0,9670
Ricinolsäure . .	0,9560	[($^1/_{40}$) 0,9790]	0,9720	20,0	0,9704
Crotonolsäure .	0,9890	[($^1/_{40}$) 1,008]	0,9778	—	—

(Da dieser letztere Wert dem spez. Gew. des reinen Esters sehr nahe kommt, so ließ sich kein bestimmter Schluß auf den Prozentgehalt des mit Säure gesättigten Esters ziehen. Eine mit 5 proz. Säure [entsprechend Tab. II] versetzte Probe des reinen Esters hatte ein spez. Gew. von 0,9779.)

Pseudoricinolsäure . .	0,9540	(1/10) 0,972	0,9773	10,0	0,9752

Bedeutung der in ( ) stehenden Bruchzahlen siehe Tab. V. Die in [ ] stehenden Zahlen sind für die Berechnung wertlos. Alle in Tab. VII angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mehreren verschiedentlich ausgeführten Bestimmungen. Ricinolsäure s. Anm. Tab. VI.

Zur Bestimmung der Löslichkeit des Esters in Öl bzw. Säure wurden kleine Mengen (0,02 bis 0,5 g) Ester im Reagenzglase mit Öl bzw. Säure versetzt, im Wasserbade unter Umrühren auf 60° erwärmt und unter fortgesetztem Rühren auf 36 bis 37° abgekühlt. Mit dem allmählichen Zusatz abgewogener Mengen Öles bzw. Säure wurde so lange fortgefahren, bis bei der angegebenen Temperatur von 36 bis 37° unter Umrühren beginnende Trübung eintrat.

Tabelle VIII.

Ester g	Gelöst in g Öl bzw. Säure bei 60°	Beginnende Trübung bei °	Proz.
0,5	15,6 Olivenöl	37,6	3,35
0,05	19,3 Ricinusöl	37,6	0,26
0,5	12,5 Ölsäure	37,5	4,11
0,05	15,2 Ricinolsäure	37,0	0,33
0,028	3,28 Pseudoricinolsäure	36,2	0,85
0,02	2,3 Crotonolsäure	36,5	0,87

Bestimmung der Löslichkeit der Öle bzw. Ölsäuren im Ester mittels der Hüblschen Jodzahl[1]).

Die Proben wurden in der gleichen Weise wie bei den vorher angegebenen Methoden hergestellt. Nach 2-, 8- und 14tägigem Abpressen ergaben sich folgende Zahlen:

	Jodzahl der reinen Öle usw.	Prozentgehalt des mit Öl bzw. Ölsäure gesättigt. Esters an Öl bzw. Ölsäure nach		
		2täg. Abpr.	8täg. Abpr.	14täg. Abpr.
Olivenöl.	86,7	30,0	10,0; 13,0	11,4; 9,2
Ricinusöl	86,2	40,4	27,3	27,6; 27,5
Ölsäure	84,2	16,8; 16,0	14,0; 20,0	6,9; 9,1
Ricinolsäure.	84,2	21,0; 19,0	24,4; 30,7	25,3
Pseudoricinolsäure . .	89,4	16,8; 15,3	16,6; 15,9	0
Ester	32,2	—	—	—

1) Benedikt-Ulzer, Anal. d. Fette u. Wachsarten 1903, 4. Aufl., S. 195.

Zur Kontrolle der erhaltenen Zahlen wurden Gemenge des Esters mit Ölen bzw. Ölsäure dargestellt, deren Prozentgehalt den Mittelwerten der nach 14tägigem Abpressen erhaltenen entsprach. Für die Pseudoricinolsäure wurde ein Gemenge mit 16 Proz. Säuregehalt dargestellt.

Eine Probe, enthaltend:

Eine Probe, enthaltend:	ergab auf Grund der Jodzahlbestimmung einen Prozentgehalt von		
10 proz. Olivenöl	— 7,8	— 9,8;	5,4
27 „ Ricinusöl	37,8	19,7;	19,5
8 „ Ölsäure	— 2,5	7,9;	0,3
25 „ Ricinolsäure	9,25	13,9;	13,8
16 „ Pseudoricinolsäure	0	— 2;	2,0

XVIII.

Untersuchungen über den Glykogenumsatz in der Kaninchenleber.

Dritte Mitteilung.

Von Prof. Dr. med. **Ivar Bang** und den Amanuensen **Malte Ljungdahl** und **Verner Bohm.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Lund.

Nachdem wir in zwei vorangehenden Mitteilungen unsere Ergebnisse über den Glykogenumsatz der Leber nach verschiedenen Einwirkungen mitgeteilt haben, bleibt uns noch übrig auszuführen, in welcher Weise die verschiedenen Gifte Glykosurie bewirken, und ob auch in diesen Fällen das Leberglykogen beteiligt ist oder nicht.

Bekanntlich bewirkt die Einführung zahlreicher verschiedener Gifte eine Zuckerausscheidung im Harn. Wir haben davon nur einige eingehender berücksichtigt, und zwar solche, die schon früher in verschiedener Richtung studiert worden sind.

Diese Untersuchungen zerfallen in zwei Abschnitte. Einerseits stellen wir die Ergebnisse nach Vergiftungen mit Morphin und Strychnin, andererseits jene nach Vergiftungen mit Phlorizin und Phloretin zusammen.

8. Der Glykogenumsatz in der Kaninchenleber nach Vergiftungen mit Morphin und Strychnin.

Morphin und Strychnin wurden als Beispiele der Gifte gewählt, weil man die Glykosurien nach Vergiftung damit bereits mit dem Umsatz des Leberglykogens in Verbindung gesetzt hat (z. B. Pflüger dessen „Glykogen“, S. 526). Nach Eckhards Angaben soll Morphin in derselben Weise wie die Piqûre Glykosurie hervorrufen, d. h. durch Einwirkung auf das „Zuckerzentrum“

der Leber. Nach Eckhard ist auch die Zuckerausscheidung nach Morphinvergiftung eine konstante. Wir sind genau Eckhards Angaben gefolgt.

Die Tiere wurden meist eine Stunde nach der Morphineinspritzung laparotomiert, nur Nr. 132 erst nach zwei Stunden. Nr. 129 bekam 0,06 g Morphin. hydrochlor. subcutan, die übrigen 0,05 g intravenös. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die Methodik wie in den früheren Versuchsreihen.

Tabelle I[1]).

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.	Harnzucker
129	1800	83	9,0	10,8	0,88	9,8	0
130	2300	100	4,4	4,4	0,44	10,0	—
131	2500	100	6,2	6,2	1,15	18,5	0
132	2000	151	19,9	13,2	2,83	14,2	+
		Mittel . .	9,9	—	1,33	13,1	—

Die Versuche zeigen eine mäßige Vermehrung der Fermentquantität der Leber, welche jedoch genügt, um die Zuckerausscheidung zu erklären. Es ist leider nicht untersucht, wie die Fermentmengen sich zu verschiedenen Zeiten nach der Einspritzung verhalten. In Anbetracht der geringen Zuckermenge im Harn darf man annehmen, daß die Einwirkung des Giftes sich hier erst recht spät geltend machen kann und daß die Verhältnisse in dieser Beziehung von jenen bei den meisten früher besprochenen Einwirkungen abweichen. Aus diesem Gesichtspunkte ist erklärlich, daß Versuch Nr. 131 keine Zuckerausscheidung aufzuweisen vermag, trotzdem hier die größte Fermentmenge der Leber vorliegt. Die Fermentproduktion der Leber hat nicht lange genug gedauert, um sich durch Ausscheidung von Harnzucker zu äußern.

Die Strychninvergiftung bietet ein spezielles Interesse dar. Es ist denkbar, daß das Strychnin durch direkte nervöse Erregung Fermentproduktion bewirken kann, aber es ist auch nicht unwahrscheinlich, daß die Strychninkrämpfe mitbeteiligt sind. Die Krämpfe könnten möglicherweise das Muskelglykogen besonders in Anspruch nehmen oder sie könnten auch reflektorisch die Fermenttätigkeit der Leber beeinflussen. Das Strychnin könnte somit Fermentproduktion in der Leber auf verschiedene Weise hervor-

[1]) Versuche von Bohm.

rufen. Unsere Versuche haben auch ein dem entsprechendes Ergebnis geliefert. Sie sind in der Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle II[1]).

Versuchs-Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
133	3000	120	10,0	8,3	1,69	16,9
134	1900	120	11,0	9,2	3,62	32,9
135	1900	110	16,0	14,5	2,82	19,5
		Mittel . .	12,3	—	2,71	23,1

Nr. 133 bekam 1,8 mg Strychnin und nach einer halben Stunde (ohne Krämpfe) noch 1,8 mg, subcutan. Starke Konvulsionen, Narkose. Leberexstirpation nach 45 Minuten (von der ersten Injektion gerechnet). Der Harn reduzierte schwach.

Nr. 134 bekam 1,2 mg subcutan. Nach einer Viertelstunde starke Krämpfe, welche 1/4 Stunde dauerten. Das Tier war dann moribund. Leberexstirpation ohne Narkose.

Nr. 135 bekam 1 mg subcutan. Nach 15 Minuten Krämpfe, welche kontinuierlich 1/4 Stunde dauerten. Narkose, Leberexstirpation.

Die Versuche zeigen einen wesentlich größeren Glykogenumsatz als bei der Morphinvergiftung. Weiter ist zu bemerken, daß hier schon nach einer halben Stunde eine starke Vermehrung der Fermentmenge nachgewiesen ist, während sie bei Morphinvergiftung höchstwahrscheinlich erst später eintritt. Dies wurde beobachtet, trotzdem das Strychnin subcutan, das Morphin aber intravenös eingespritzt wurde. In beiden Fällen ist aber eine vermehrte Fermentproduktion der Leber nachgewiesen, und man ist dementsprechend berechtigt, anzunehmen, daß die nach diesen Vergiftungen auftretende Glykosurie einer Vermehrung der Enzymmenge entspricht, was auch mit der jetzigen Auffassung im Einklang steht.

9. Der Glykogenumsatz in der Kaninchenleber nach Vergiftungen mit Phlorizin und Phloretin.

Unter den Giften nehmen Phlorizin und Phloretin eine ganz besondere Stellung ein, indem sie eine reichliche Glykosurie bewirken, ohne daß den meisten Angaben zufolge der Blutzuckergehalt vermehrt ist. Allerdings ist dieser Befund, welcher durch zahlreiche Analysen verschiedener Untersucher bestätigt worden ist, nicht ganz allgemein akzeptiert worden, indem Pavy — dessen

[1]) Versuche von Bohm, sämtliche spätere von Bang.

Ansicht Pflüger sich anschließt — nach Phlorizineinspritzung ein Ansteigen des Blutzuckergehaltes von 0,1 Proz. auf 0,23 Proz. beobachtete, also genau dieselben Werte, welche wir nach Vagusreizung gefunden haben. Indessen ist zu bemerken, daß Pavy den Alkoholauszug des Blutes erst invertierte. Hierdurch wird ja ein neues Moment eingeführt, dessen Bedeutung nicht zu übersehen ist. Andererseits hat Zuntz gefunden, daß diejenige Niere, welcher mit dem Blute zuerst Phlorizin zugeführt wird, eher zuckerhaltigen Harn absondert als die andere. Weiter hat v. Mering Zuckerausscheidung bei entleberten Fröschen und Gänsen nach Phlorizinvergiftung beobachtet. Unterbindung der Ureteren ruft auch keine Vermehrung des Blutzuckergehaltes hervor. Die Ursache des Phlorizindiabetes ist deswegen noch dunkel. Am meisten darf man wahrscheinlich v. Merings Auffassung zuneigen: die Phlorizinvergiftung bewirkt einen Nierendiabetes.

Selbst unter dieser Voraussetzung hat es aber ein nicht geringes Interesse, den Glykogenumsatz der Leber festzustellen. Entweder wird der Zucker ganz unabhängig in der Niere sowohl produziert als ausgeschieden — in diesem Falle ist und bleibt die Leber ganz unbeteiligt — oder es bewirkt das Phlorizin eine vermehrte Durchlässigkeit der Niere und Zucker wird in größerem Maßstabe aus dem Blute eliminiert. Bleibt in diesem Falle der Blutzuckergehalt unverändert, muß anderswo eine der Ausscheidung entsprechende vermehrte Zuckerproduktion vorkommen. Man hat in dieser Beziehung vor allem an die Leber zu denken.

Bei den folgenden Versuchen wurde das Phlorizin intraperitoneal eingespritzt, in den Versuchen Nr. 137, 138 und 144 2 g, in den Versuchen Nr. 139 und 140 0,7 g und in den übrigen 0,5 g. Der Harn enthielt immer, mit Ausnahme von Versuch Nr. 141, reichlich Zucker, gewöhnlich über 1 Proz. Wir lassen die Versuche folgen.

Tabelle III.

Versuchs-Nr.	Zeit nach Einspritzung Stunden	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
137	1	2500	102	10,0	9.8	0,78	7,8
138	1	1900	136	15,3	11,2	1,22	8,0
139	1	800	98	5,5	5,7	0,46	8,4
140	1	900	111	8,0	7,3	0,80	10,0
			Mittel . .	9,7	—	0,82	8,6

Versuchs-Nr.	Zeit nach Ein-spritzung Stunden	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamt-glykogen g	Glykogen Proz.	Gesamt-umsatz g	Umsatz Proz.
141	1½	900	114	9,3	8,2	0,75	8,1
142	1½	750	71	4,0	5,6	0,54	13,5
143	1½	900	69	4,5	6,5	0,68	15,0
			Mittel . .	5,9	—	0,66	12,2
144	2	1700	100	12,5	12,5	1,13	9,0
145	2	900	130	5,3	3,9	0,28	5,0
			Mittel . .	8,9	—	0,71	7,0

Auf Grund des Ergebnisses dieser neun Versuche kann man kaum von einer wesentlich vermehrten Fermentproduktion der Leber sprechen. Zwar zeigen die Versuche Nr. 142 und Nr. 143 eine recht erhebliche Vermehrung an, in diesen Fällen aber ist der Glykogengehalt der Leber geringer als sonst.

Dagegen scheint es nicht ganz ausgeschlossen, daß ein geringes Ansteigen der Fermentquantität der Leber vorliegen kann, welches mit der Elimination des Blutzuckers in Verbindung gesetzt werden könnte. Die gefundenen Werte weichen jedoch zu wenig von den normalen ab, als daß man hierüber etwas Bestimmtes sagen könnte.

Als Mangel dieser Untersuchungen könnte angesehen werden, daß wir keine Glykogenbestimmung kürzere Zeit, z. B. eine halbe Stunde, nach der Einspritzung ausgeführt haben. Hierzu ist zu bemerken, daß es bei der allmählichen Assimilation des Phlorizins unmöglich ist, den Anfang der Wirkung bestimmt zu fixieren.

Da wir also keine ganz bestimmte Schlußfolgerung über die Beteiligung der Leber beim Phlorizindiabetes ziehen konnten, haben wir versucht, der Frage von einem anderen Ausgangspunkte aus näher zu treten.

Bei der Piqûre ist von uns eine Vermehrung des Glykogenumsatzes der Leber erwiesen. Ebenso ist bekannt, wie auch unsere Bestimmungen erwiesen haben, daß der Blutzucker bei Piqûre vermehrt ist. Wenn nun die Niere bei der Phlorizinvergiftung auch den Zucker aus dem Blute eliminiert, so ist zu erwarten, daß der Blutzuckergehalt bei Piqûre und Phlorizinvergiftung jedenfalls nicht so hoch wie nach Piqûre allein ansteigen kann. Wir besitzen hierüber zwei Versuche.

1. Ein Kaninchen von 900 g hatte 16 Stunden vorher 30 g Rohrzucker mit der Sonde erhalten. 10 Uhr 5 Min. vormittags 1 g Phlorizin intra-

peritoneal. 10 Uhr 30 Min. Zuckerstich. 11 Uhr 20 Min. wurden 47,5 g Blut entnommen. Blutzuckergehalt = 0,22 Proz. Die Leber glykogenreich. 12 ccm Harn mit 3,7 Proz. Zucker.

2. Ein Kaninchen von 2400 g hatte 16 Stunden vorher 30 g Rohrzucker mit der Sonde erhalten. 11 Uhr 1 g Phlorizin. 11 Uhr 15 Min. Zuckerstich. Um 12 Uhr wurden 61,9 g Blut entnommen. Blutzuckergehalt = 0,17 Proz. Die Leber glykogenreich. 35 ccm Harn mit 3,5 Proz. Zucker.

Es scheint darnach, daß man bei Phlorizinvergiftung und Piqûre ein geringeres Ansteigen des Blutzuckers erhält, als bei der Piqûre allein. Wenn aus nur zwei Versuchen eine Folgerung erlaubt ist, spricht dieses Ergebnis für die Auffassung, daß bei Phlorizinvergiftung der Zucker in größerem Maßstabe als normal aus dem Blute eliminiert wird. Wenn die Blutzuckerkonzentration dessenungeachtet unverändert bleibt, muß man eine dem entsprechende Zuckerproduktion anderswo annehmen.

Diese Auffassung findet eine interessante Analogie in den Untersuchungen von Bock über das Schicksal von in die Blutbahn eingeführtem Kaliumchlorid. (Zwei Versuche sind von Hald im Archiv f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 53, 227, veröffentlicht, viele andere interessante Versuche werden demnächst von Prof. Bock publiziert werden.) Injiziert man Kaninchen Kaliumchlorid intravenös, so treten große Mengen KCl im Harne aus, während der KCl-Gehalt des Blutserums vor und nach der Injektion ganz unverändert bleibt.

Allerdings wird dabei auch in den Organen Kali deponiert, denn auch bei nephrektomierten Tieren bleibt der Kaliumgehalt des Serums der gleiche.

So wie hier die Konzentration des Blutes zu Kalium unverändert bleibt, während davon im Harn reichliche Mengen erscheinen, könnte man annehmen, daß es sich mit dem Zucker beim Phlorizindiabetes verhält. Der Unterschied bestände darin, daß die Niere gegenüber Kali von vornherein die Fähigkeit einer raschen Ausscheidung besitzt, während sie gegenüber Zucker diese Fähigkeit erst durch das Phlorizin erhielte.

Das Glykosid Phlorizin liefert bei der Hydrolyse Zucker und Phloretin. Es ist anzunehmen, daß ein Teil des ausgeschiedenen Zuckers aus dem eingeführten Phlorizin herstammt, was die Versuchsergebnisse komplizieren kann. Gegen mehrere solche, z. B. v. Merings Versuche mit entleberten Tieren, hat in der Tat Pflüger den Einwand erhoben, daß sich die beobachtete Zuckerausscheidung vielleicht schon hieraus erklären läßt.

Diese Fehlerquelle ist bei Versuchen mit Phloretin, welches auch Glykosurie bewirkt, ausgeschlossen.

Deshalb haben wir Versuche mit Phloretinvergiftung angestellt, über welche die folgende Tabelle berichtet.

Tabelle IV.

Überall ist 0,6 g Phloretin intraperitoneal injiziert.

Versuchs-Nr.	Zeit nach Einspritzung Stunden	Gewicht des Kaninchens g	Gewicht der Leber g	Gesamtglykogen g	Glykogen Proz.	Gesamtumsatz g	Umsatz Proz.
146	1	1800	135	8,7	6,4	1,52	17,5
147	1	3000 [1])	112	7,4	6,6	1,11	15,0
148	1	2000 [1])	105	5,8	5,4	0,58	10,0
149	1	2500 [1])	118	2,5	2,1	0,78	31,0
150	1½	2400	102	8,2	8,0	0,92	11.2
151	1½	1800 [1])	104	10,2	9,8	2,72	25,7
152	2	2000 [1])	111	13,0	11,7	1,76	13,5
153	2	2400 [1])	151	14,7	9,7	1,92	13,1
			Mittel . .	8,8	—	1,36	17,2

Ein Blick auf die Tabelle zeigt, daß die Fermentproduktion nach Phloretin ganz unzweifelhaft gestiegen ist. In dieser Beziehung besteht somit ein deutlicher Unterschied zwischen Phlorizin und Phloretin. Und dieser Unterschied ist desto interessanter, als Phloretin ein Bestandteil des Phlorizins ist. Die Wirkung des Glykosids ist nicht mit der seiner Komponente identisch.

Wir haben sowohl vermehrten Glykogenumsatz als Glykosurie (in allen Versuchen) gefunden, und es fragt sich nun, wie der dritte beteiligte Faktor, der Blutzucker, sich verhält. Das Ergebnis ist aus Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V.

Versuchs-Nr.	Blut entnommen g	Blutzucker Proz.
147	46,5	0,15
148	27,5	0,14
149	49,4	0,13
151	33,6	0,12
152	46,5	0,15
153	57,9	0,10
	Mittel . .	0,13

(Aderlaß eine Stunde nach der Phloretininjektion.)

[1]) Aderlaßkaninchen.

Die Versuche ergeben sonach das übereinstimmende Resultat, daß der Blutzuckergehalt nach der Phloretinvergiftung nicht oder jedenfalls höchst unwesentlich vermehrt ist, trotzdem ein stark vermehrter Glykogenumsatz der Leber vorliegt. Auch die Möglichkeit, daß der Zucker in einer nicht direkt nachweisbaren Modifikation vorkommt, ist auszuschließen. Im Versuche Nr. 153 wurde die Zuckerlösung auch nach Inversion titriert; es wurde genau dieselbe Konzentration 0,10 Proz. gefunden.

Zuletzt haben wir in zwei Versuchen die Phloretinvergiftung mit der Piqûre kombiniert.

Versuch Nr. 154. Kaninchengewicht 2100 g. 30 g Rohrzucker 16 Stunden vorher. 11 Uhr 7 Min. 0,6 g Phloretin. 11 Uhr 37 Min. Zuckerstich, 12 Uhr 37 Min. Aderlaß. 41,4 g Blut entnommen mit einem Zuckergehalte von 0,25 Proz. Die Leber, = 147 g, enthält 8 g Glykogen = 5,4 Proz. 45 ccm Harn mit 0,35 Proz. Dextrose.

Versuch Nr. 155. Kaninchen 2000 g. 30 g Rohrzucker 16 Stunden vorher. 11 Uhr 0,6 g Phloretin. 11 Uhr 30 Min. Zuckerstich. 12 Uhr 30 Min. 50,4 g Blut entnommen mit dem Zuckergehalt = 0,27 Proz. Die Leber war 118 g schwer. Glykogen = 5,4 g oder 4,6 Proz. Der Glykogenumsatz betrug in 4 Stunden 17,2 Proz. 50 ccm Harn mit 0,45 Proz. Dextrose.

Die Versuche zeigen bei der Phloretinvergiftung auch nach der Piqûre ein geringeres Ansteigen des Blutzuckergehaltes. Der Unterschied ist jedoch nicht so prägnant wie bei der Phlorizinvergiftung. Nimmt man an, daß die Phloretinvergiftung an sich eine geringe Vermehrung des Blutzuckergehaltes bewirkt, so erscheinen die nach Phloretin + Piqûre gefundenen Werte 0,25 Proz. und 0,27 Proz. noch mehr beweiskräftig.

Die Ergebnisse bei der Phloretinvergiftung geben deswegen der Auffassung eine weitere Stütze, daß dabei die Niere eine vermehrte Fähigkeit zur Elimination des Blutzuckers besitzt. Es ist allerdings ganz unentschieden, ob die Wirkung auf die Leber von der Niere reflektorisch ausgelöst ist, oder ob die Gifte sowohl auf die Niere als auch auf die Leber einwirken. Unwahrscheinlich wäre es nicht, daß die Wirkungen auf beide Organe zentraler Art sind.

Bei den meisten angeführten Versuchen sind die Nieren auf Zucker untersucht worden. Es hat sich herausgestellt, daß der Zuckergehalt — auf feuchte Nierensubstanz berechnet — nach Vergiftung mit Phlorizin und Phloretin nicht unwesentlich, d. h. bis etwa 0,4 bis 0,5 Proz. Zucker (gegen normal 0,1 bis 0,2 Proz.) gestiegen ist. Ein solches Ansteigen findet man z. B. nicht nach der Piqûre. Indessen sind die Werte zu klein, als daß man hieraus zu bestimmten Folgerungen berechtigt wäre.

XIX.

Untersuchungen über das Verhalten der Leberdiastase bei Pankreasdiabetes.

Von **Ivar Bang.**

Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Universität zu Lund.

Im Anschluß an die drei früheren Mitteilungen über den Glykogenumsatz in der Kaninchenleber unter verschiedenen Versuchsbedingungen hatte es nicht geringes Interesse, das einschlägige Verhalten bei Pankreasdiabetes zu untersuchen.

Bekanntlich hat man noch keine befriedigende Auffassung des Pankreasdiabetes gewonnen. Zwar weiß man, daß die Pankreasexstirpation den Diabetes veranlaßt, dagegen sind die Meinungen über den ursächlichen Vorgang sehr verschieden. Einige neigen der Annahme einer inneren Sekretion des Pankreas zu, andere, wie z. B. Pflüger, stellen die Bedeutung des Nervensystems in den Vordergrund.

Die folgenden Untersuchungen hatten nicht zum Zweck, dieses schwierige Problem direkt aufzuklären, vielmehr habe ich mich auf die Frage beschränkt, wie der Glykogenumsatz oder richtiger wie das diastatische Enzym der Leber sich beim Pankreasdiabetes verhält.

Diese Frage hat an sich genügendes Interesse. Erstens darf jede Vermehrung unserer Kenntnis über das Verhalten des Organismus bei dieser Krankheit Bedeutung beanspruchen, und zweitens wissen wir, daß die Leber bei Pankreasdiabetes äußerst arm an Glykogen bzw. ganz glykogenfrei ist. Die in den früheren Mitteilungen gefundene Beziehung zwischen Glykogenumsatz und Diastase war genügender Anlaß zu solchen Untersuchungen.

Bei Versuchen über den Glykogenumsatz bei pankreasdiabetischen Tieren sollte man zum Vergleich den Umsatz bei den

entsprechenden normalen, wohlgenährten Tieren kennen. Leider besitze ich keine solche Bestimmungen, da mir äußere Verhältnisse Versuche an Hunden sehr erschweren. Ich bin deswegen für die folgenden Versuche gezwungen, die an Hunden mit Pankreasdiabetes gewonnenen Ergebnisse mit den Erfahrungen an normalen Kaninchen zu vergleichen, was ich zur Reserve von vornherein hervorheben möchte.

Es wurden drei Versuche angestellt. Die Tiere wurden wie gewöhnlich unter Erhaltung der Venen operiert. Zum Überfluß wurde nach Pawlow das Netz um den Darm genäht, was sich als vorteilhaft erwiesen hat. Ich bin meinen Freunden, Herrn Professor Dr. med. Forssman und Herrn Dr. G. Petrén, welche die Tiere für mich operiert haben, zu großem Dank verpflichtet.

Versuch Nr. 1. Weiblicher Foxterrier, 15 kg schwer, 6 Monate alt. Am 7. Februar nach Minkowski-Pawlow operiert. Am 8. Februar: Zustand gut. Kein Harn. $^1/_2$ Liter Milch. 9. Februar: 120 ccm Harn mit 2,7 Proz. Zucker. $^1/_2$ Liter Milch, wird erbrochen. 10. Februar: Zustand gut. Keine Temperatursteigerung. $^3/_4$ Liter Milch, etwas trockenes Brot. 160 ccm Harn mit 6 Proz. Zucker. 11. Februar, morgens früh: Fleisch, etwas Wurst und etwa $^3/_4$ Liter Milch. 250 ccm Harn mit 10 Proz. Zucker. Um 1 Uhr Chloroformnarkose. Leberexstirpation. Gewicht der Leber 394 g. Leber stark gelb gefärbt. Wurde durchgespült, zerhackt usw. und in gewogenen Proben à 25 g mit einer 10,36 proz. Glykogenlösung (25 ccm) versetzt. Keine Infektion.

Glykogengehalt der Leber = 0,06 Proz.

Glykogenumsatz der mit Glykogenlösung versetzten Probe = 14 Proz.

Versuch Nr. 2. Weiblicher Neufundländer. 40 kg schwer, 8 Monate alt. 8. Februar: Pankreasexstirpation. 9. Februar: Zustand gut. 240 ccm Harn mit 2,8 Proz. Zucker. 10. Februar: 570 ccm Harn; 5,6 Proz. Dextrose. $1^1/_4$ Liter Milch, etwas trockenes Brot. 11. Februar: 300 ccm Harn; 8,4 Proz. Zucker. $^3/_4$ Liter Milch, etwas (200 bis 300 g) Fleisch. 12. Februar: 1000 ccm Harn mit 10,7 Proz. Zucker. Morgens etwas Fleisch. Um 1 Uhr Chloroformnarkose, Leberexstirpation. Die Leber ikterisch, Gewicht = 718 g. Keine Peritonitis. Die Leber glykogenfrei.

Glykogenumsatz in der mit Glykogenlösung (10,36 Proz.) versetzten Probe = 9,7 Proz.

Versuch Nr. 3. Männlicher Dachshund, 8 kg schwer. 8. März: Pankreasexstirpation. 9. März: Zustand gut. Kein Harn. 30 ccm Milch. 10. März: Milch erbrochen. Etwas Harn (mit Milchgerinseln gemischt), reduziert stark. Später 40 ccm Harn mit 6,5 Proz. Dextrose. 11. März: Wasser wird erbrochen. Chloroformnarkose, Leberexstirpation. Gewicht der Leber = 290 g. Keine Peritonitis. Die Leber glykogenfrei.

Glykogenumsatz in der mit Glykogenlösung (10,04 Proz.) versetzten Probe = 6,9 Proz.

Sämtliche drei Versuche haben also einen gelungenen Pankreasdiabetes ergeben. Die Zuckerausscheidung trat gleich von Anfang

an ein und stieg in den ersten Tagen zu einer beträchtlichen Höhe (6 bis 10 Proz.) an.

Die Lebern waren bei zwei Tieren glykogenfrei, bei dem dritten wurden 0,06 Proz. Glykogen gefunden. In den ersten zwei Versuchen haben aber die Tiere fortwährend Nahrung bekommen, darunter relativ reichliche Mengen Kohlehydrat (Milchzucker).

In einem bestimmten Widerspruch hiermit steht das Verhalten der Leberdiastase, wie es besonders aus dem Versuch Nr. 2 hervorgeht. Hier ist ein Glykogenumsatz von 9,7 Proz. gefunden, was einer Fermentquantität entspricht, die nur unwesentlich die bei normalen, wohlgenährten Kaninchen gefundenen Werte übersteigt. In Versuch Nr. 1 ist zwar der Umsatz 14 Proz.; im dritten aber nur 6,9 Proz. Der durchschnittliche Umsatz, dem der größte Wert beigemessen werden muß, ist 9,5 Proz.

Wenn man sich nun ferner erinnert, daß die letzten Spuren Glykogen nur langsam von dem Enzym umgesetzt werden, wie ja dementsprechend bei Hunger das Glykogen erst nach mehreren Tagen ganz verschwindet, trotzdem wir (siehe erste Mitteilung) für Hungerkaninchen eine vermehrte Fermentproduktion nachgewiesen haben, so muß die Tatsache noch mehr befremden, daß bei diesen Versuchen kein oder nur eine Spur von Glykogen gefunden wurde, obgleich die Tiere Nahrung bekamen und keine wesentlich vermehrte Fermentproduktion aufzuweisen hatten. (Auch im Versuch Nr. 1 kann der gefundene Glykogenumsatz unmöglich den äußerst geringen Glykogengehalt von 0,06 Proz. erklären.) Diese Tatsache läßt sich wohl kaum anders erklären als durch die Annahme, daß bei Pankreasdiabetes nicht der Glykogenumsatz, sondern hauptsächlich die **Glykogenbildung** verändert ist.

Bei Pankreasdiabetes ist somit wahrscheinlich die Glykogenbildung entweder aufgehoben oder stark vermindert. In dieser Beziehung bildet der Pankreasdiabetes einen Gegensatz zu den früher besprochenen Diabetesformen, besonders jenen nach Nervenverletzungen und Piqûre. Dagegen ist bekanntlich bei den genuinen Diabetesformen des Menschen oft eine verminderte Assimilationsgrenze für Kohlehydrate nachgewiesen worden.

Es fragt sich dann weiter, ob man hieraus die großen Zuckerausscheidungen erklären kann. Selbstverständlich ist dies nicht der Fall. Die ausgeschiedenen Zuckerquantitäten sind weit größer, als den Kohlehydraten der Nahrung, wie z. B. in Versuch Nr. 2,

entspricht. Bekanntlich ist man jetzt mit guten Gründen zu der Auffassung gekommen, daß der ausgeschiedene Zucker auch von Eiweiß oder Fett oder beiden herstammen muß. Diese werden folglich erst zu Zucker umgesetzt und dann als solcher ausgeschieden. Dagegen ist es klar, daß das Fehlen der Glykogenbildung dabei nicht gleichgültig sein kann. Wäre die Fähigkeit der Glykogenbildung erhalten, so wäre auch bei sehr ausgiebigem Fett- und Eiweißumsatz die Zuckerausscheidung unmöglich.

Überhaupt ist es a priori nicht unmöglich zu behaupten, daß das Fehlen der Glykogenbildung allein neben normaler Zuckerproduktion aus Fett und Eiweiß genügt, um den Diabetes zu erklären. Andererseits kann man auch daran denken, daß das Fehlen der Glykogenbildung eben eine vermehrte Zuckerproduktion aus Fett und Eiweiß auslösen könnte. Hierüber geben die Versuche aber keinen Aufschluß.

In Verbindung mit der Untersuchung über die Leberdiastase habe ich auch einige Versuche über eine eventuelle Zuckerbildung in der Leber aus Aminosäuren und Fett angestellt. Bekanntlich haben solche Versuche bei normalen Lebern ein völlig negatives Ergebnis geliefert. Es bleibt aber noch zu untersuchen, wie sich die Leber beim Pankreasdiabetes verhält. Zu abgewogenen Proben der Leber (Versuch Nr. 3) wurden Fett, Glykokoll, Leucin und Alanin zugesetzt. Das Fett (Olivenöl) wurde erst emulgiert und teils mit dem Leberbrei allein, teils mit Leber und Blut digeriert. Keine Probe ergab einen vermehrten Zuckergehalt. Diese Tatsache schließt aber nicht aus, daß intravital ein solcher Umsatz in höherem Maßstabe stattfindet. Inwieweit es notwendig ist, einen solchen anzunehmen, ist eine andere Sache. Die vermehrte Zuckerausscheidung nach Fütterung mit Aminosäuren läßt sich wohl auch aus dem Fehlen der Glykogenbildung allein erklären.

XX.

Versuche über Harnsäuresynthese beim Menschen und Säugetier[1]).

Von Dr. **Wilhelm Pfeiffer,**
Assistenten der medizinischen Klinik zu Kiel.

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg und dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Kiel (Direktor: Prof. Quincke).

Daß beim Säugetier Harnsäure durch Oxydation von Purinkörpern gebildet wird, ist durch zahlreiche Untersuchungen außer Zweifel gestellt, insbesondere durch die Versuche Weintrauds[2]), Umbers[3]), Burian und Schurs[4]), Schreibers und Waldvogels[5]).

Mit der Frage der synthetischen Harnsäurebildung beim Menschen und Säugetier — nach Analogie der Harnsäurebildung im Vogelorganismus, wo der überwiegende Anteil der Harnsäure synthetisch entsteht — haben sich dagegen bisher nur wenige Autoren befaßt.

---

[1]) Auszug aus der Habilitationsschrift des Verfassers: „Synthese und Abbau der Harnsäure beim Menschen und Säugetier." Kiel 1907.

[2]) Weintraud, Über den Einfluß des Nucleïns der Nahrung auf die Harnsäurebildung. Berl. klin. Wochenschr. 32 (19), 405 (1895).

[3]) Umber, Über den Einfluß nucleïnhaltiger Nahrung auf die Harnsäurebildung. Zeitschr. f. klin. Med. 29, 174 (1896).

[4]) Burian und Schur, Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel. Erste Mitteilung. Pflügers Arch. 80, 241 (1900). — Über Nucleïnbildung im Säugetierorganismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 23, 55 (1897). — Über die Stellung der Purinkörper im menschlichen Stoffwechsel. Zweite Mitteilung. Pflügers Arch. 87, 239 (1901).

[5]) Schreiber und Waldvogel, Beitrag zur Kenntnis der Harnsäureausscheidung unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 69 (1899). — Man vgl. überdies die zusammenfassenden Darstellungen von Schittenhelm (Zentralbl. f. Stoffwechsel- u. Verdauungskrankheiten, 5. Jahrg. 1904, S. 226 und Medizinische Klinik, 4. Beiheft 1907, S. 89).

Horbaczewski[1]) war in vitro die Synthese der Harnsäure aus Glykokoll und Harnstoff gelungen, und er verfütterte daher Glykokoll. Dabei zeigte sich nur eine geringe Zunahme der Harnsäure. Gleiche Ergebnisse hatte Weiss[2]). Da Minkowski[3]) nach Leberexstirpation bei Vögeln (die Leber ist im Vogelorganismus dasjenige Organ, in welchem die Harnsäure synthetisch gebildet wird) das Auftreten von fleischmilchsaurem Ammon beobachtet hatte, so versuchte er an Hunden durch Zufuhr von fleischmilchsaurem Ammon und von Harnstoff eine Harnsäurevermehrung zu erzielen; sie blieb aus.

Auch Fütterungsversuche am Menschen, die Herrmann[4]) und Weiss[5]) ausführten, hatten das gleiche Ergebnis.

Steudel[6]) verfütterte Uracil und andere Pyrimidinderivate in der Erwartung einer synthetischen Bildung von Purinkörpern, doch ohne Erfolg.

Ausgedehnte Versuche über synthetische Harnsäurebildung an Hühnern, Hunden und Menschen führte Wiener[7]) aus. Er hatte nachgewiesen, daß die Leber mit Alkoholextrakten, die aus verschiedenen Organen bereitet und sicher frei von Nucleïn und Xanthinbasen waren, Harnsäure bildet, daß es sich dabei also nicht um eine oxydative, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach um eine synthetische Bildung der Harnsäure handelt.

Seine Versuche an Hühnern, welche bestimmte noch zu besprechende Substanzen erhielten, ergaben eine geringe Harnsäurevermehrung.

Mit Rücksicht auf die oben erwähnte Beobachtung Minkowskis über das Auftreten von Ammoniumlaktat nach Leberexstirpation,

---

[1]) Horbaczewski, Synthese der Harnsäure. Monatshefte f. Chemie 3, 796 (1882), zitiert bei Wiener, S. 31.

[2]) Weiss, Weitere Beiträge zur Erforschung der Bedingungen zur Harnsäurebildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 216 (1899).

[3]) Minkowski, Über den Einfluß der Leberexstirpation auf den Stoffwechsel. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 21, 89 (1886).

[4]) Herrmann, Über die Abhängigkeit der Harnsäureausscheidung von Nahrungs- und Genußmitteln mit Rücksicht auf die Gicht. Deutsch. Arch. f. klin. Med. 43, 273 (1888).

[5]) Weiss, Beiträge zur Erforschung der Bedingungen der Harnsäurebildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 393 (1898).

[6]) Steudel, Das Verhalten einiger Pyrimidinderivate im Organismus. Ebenda 32, 285 (1901).

[7]) Wiener, Über Zersetzung und Bildung von Harnsäure im Tierkörper. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 42, 375 (1899). — Über synthetische Bildung der Harnsäure im Tierkörper. Diese Beiträge 2, 42 (1902).

kamen da Milchsäure und die ihr nahestehenden Stoffe der Propanreihe, daneben solche der Butanreihe zunächst in Betracht.

Neben der stickstofffreien Komponente führte Wiener den Versuchstieren Harnstoff zu, um dem Körper die eventuelle Harnsäurebildung zu erleichtern. Er konnte ferner ausschließen, daß die beobachtete Harnsäurevermehrung im Harn auf einer diuretischen Wirkung beruht. Er verwandte zu seinen Versuchen an Hühnern Glycerin, Propionsäure, Milchsäure, Hydracrylsäure (Äthylenmilchsäure), Brenztraubensäure, Malonsäure, Tartronsäure, Mesoxalsäure, Buttersäure, α-Oxybuttersäure, β-Oxybuttersäure, Bernsteinsäure und Äpfelsäure. Wiener faßt das Ergebnis seiner Untersuchungen in die Worte zusammen: „Die höheren einbasischen Säuren der aliphatischen Reihe dürften durch Einsetzen der Oxydation in der dem Carboxyl benachbarten Atomgruppe und wiederholte Kohlensäureabspaltung allmählich zu solchen mit immer niedrigerem Kohlenstoffgehalt abgebaut werden, bis sie in die entsprechenden Säuren mit einer Kette von drei Kohlenstoffatomen umgewandelt sind. Ist dieses Oxydationsprodukt Propionsäure, so geht der Abbau bis zur Bildung von Kohlensäure und Wasser weiter. Ist das Produkt hingegen eine Oxy- oder Ketonsäure, dann setzt, wenigstens zum Teil, die Oxydation auch in der dem Carboxyl entgegengesetzten Atomgruppe ein, so daß zunächst die entsprechenden zweibasischen Säuren entstehen. Diese werden aber dann nicht weiter abgebaut, sondern vollständig zur Harnsäuresynthese verwendet, wenn genug geeignete stickstoffhaltige Substanz zur Verfügung steht."

Wiener dachte sich den Weg der Harnsäurebildung im Vogelorganismus etwa so:

$$\begin{array}{ccccccc}
NH_2 & & COOH & & NH-CO & & \\
| & & | & & |\quad\;\; | & & \\
CO & + & CHOH & = & CO\;\; CHOH & + & 2H_2O \\
| & & | & & |\quad\;\; | & & \\
NH_2 & & COOH & & NH-CO & &
\end{array}$$

Harnstoff + Tartronsäure = Dialursäure (Diureïd der Tartronsäure)

$$\begin{array}{ccccccc}
NH-CO & & & & NH-CO & & \\
|\quad\;\; | & & & & |\quad\;\; | & & \\
CO\;\; CHOH & + & \begin{matrix} H_2N \\ N_2N \end{matrix}\!\!>\!CO & = & \begin{matrix} CO\;\; C-NH \\ |\quad\;\; \| \\ NH-C-NH \end{matrix}\!\!>\!CO & + & 2H_2O \\
|\quad\;\; | & & & & & & \\
NH-CO & & & & & &
\end{array}$$

Dialursäure + Harnstoff = Harnsäure.

Die Versuche Wieners an Hunden führten nicht zur Harnsäurebildung. An Menschen untersuchte Wiener den Einfluß von

Milchsäure, Malonsäure und Dialursäure. (Tartronsäure stand ihm nicht in genügender Menge zur Verfügung und so wählte er ihr Diureïd.) Wiener führte gleichzeitig mit der betreffenden Substanz stets auch Harnstoff ein, um die Diurese gleichmäßiger zu gestalten und eine Synthese der betreffenden Säure mit Harnstoff zu erleichtern. Er machte stets noch einen Kontrollversuch mit Natriumacetat, um zu zeigen, daß nicht die Darreichung einer beliebigen organischen Säure denselben Effekt hat, wie die der gereichten Substanz.

Wiener fand bei allen seinen Versuchen eine mäßige Harnsäurevermehrung und glaubte damit den Beweis einer synthetischen Harnsäurebildung erbracht zu haben. Er äußert sich über diese Synthese folgendermaßen: Nur eine zweibasische Säure und ihr Ureïd (Tartronsäure und Dialursäure) werden zur Harnsäuresynthese herangezogen. Sie kann sich direkt mit zwei Harnstoffresten zu Harnsäure paaren, während bei der Malonsäure noch eine Oxydation, bei der Mesoxalsäure eine Reduktion stattfinden müßte. „Es dürften daher die wirksamen Substanzen im Tierkörper zunächst in die entsprechenden zweibasischen Säuren umgewandelt werden. Ist diese Tartronsäure, so geht sie direkt in Harnsäure über, ist sie Malonsäure, so muß sie erst durch Oxydation, ist sie Mesoxalsäure, durch Reduktion in Tartronsäure übergeführt werden, um die Synthese zu Harnsäure eingehen zu können."

Die Wahrscheinlichkeit einer von Wiener angenommenen Harnsäuresynthese beim Säugetier wurde durch den von Eppinger[1]) geführten Nachweis, daß Zufuhr von Glyoxylsäure eine Allantoinvermehrung bewirkt, gesteigert.

Allantoin ist einmal als ein Abbauprodukt der Purinkörper, besonders der Harnsäure, aufzufassen, und demgemäß findet man eine Vermehrung desselben bei Einführung von Purinbasen, Harnsäure, Thymus und Hypoxanthin. Außerhalb des Organismus wird durch Oxydation der Harnsäure Allantoin erhalten. Neben dieser oxydativen Allantoinbildung gibt es nach Eppinger im Tierkörper auch eine synthetische. In vitro kann man Allantoin synthetisch durch Erhitzen von Glyoxylsäure und Harnstoff erhalten oder durch Schmelzen von Mesoxalsäure und Harnstoff. Eppinger hat nun Körper, die er für die physiologische Vorstufe des Allantoins hielt, verfüttert, speziell Glykolyldiharnstoff, und in der Tat bei

[1]) Eppinger, Über die Bildung von Allantoin im Tierkörper. Diese Beiträge 6, 287 (1905). — Über das Verhalten der Glyoxylsäure im Tierkörper. Ebenda, S. 492.

quantitativer Bestimmung eine Vermehrung der Allantoinfraktion beobachtet, die er auf synthetische Allantoinbildung bezieht.

Beim Menschen, der für gewöhnlich kein Allantoin ausscheidet, blieb Glykolyldiharnstoff wirkungslos.

Nach den bisherigen Beobachtungen wäre aus der Tartronsäure und deren Verwandten eine Synthese zu Harnsäure zu erwarten. Ich verwandte daher in erster Linie diese zu meinen Versuchen, und zwar Tartronsäure, $[CHOH(COOH)_2]$, Tartronamid, $[CHOH(CONH_2)_2]$, und Malonamid, $[CH_2(CONH_2)_2]$. Daneben machte ich Versuche mit Allantoin und schließlich auch noch mit Pseudoharnsäure, die sich von der Harnsäure nur durch den Mehrgehalt an einem Molekül Wasser unterscheidet und auf Grund ihres chemischen Verhaltens als eine für die Harnsäurebildung besonders geeignete Vorstufe erschien.

```
NH—CO                        NH—CO
|   |                        |   |
CO  CH.NH.CO.NH2             CO  C—NH
|   |                        |   ||  >CO
NH—CO                        NH—C—NH
   Pseudoharnsäure.            Harnsäure.
```

Versuchsanordnung und Vorversuche über Zerstörung der per os eingeführten Harnsäure.

Von entscheidender Bedeutung für Versuche über das Schicksal der Harnsäure ist die Wahl des geeigneten Versuchstieres.

Der Säugetierorganismus ist befähigt, per os eingeführte Harnsäure zu zersetzen, so daß nur ein Teil davon unverändert ausgeschieden wird. Dies ist durch Untersuchungen von Wöhler und Frerichs [1]), Neubauer [2]), Meissner [3]), Weintraud [4]) und Ebstein und Nicolaier [5]) bewiesen.

Hunden kommt beispielsweise dieses Vermögen in viel höherem Grade als Kaninchen zu. Es ist nun zu berücksichtigen, daß dieses

---

1) Wöhler und Frerichs, Über Veränderungen, welche namentlich organische Stoffe beim Übergang in den Harn erfahren. Ann. d. Chem. u. Pharm. **65**, 335 (1848). Zit. bei Wiener, S. 31.

2) Neubauer, Über die Zersetzung der Harnsäure im Tierkörper. Ebenda **99**, 206 (1856).

3) Meissner, Beiträge zum Stoffwechsel im tierischen Organismus. Zeitschr. f. rat. Med. **31**, 305 (1868). Zit. bei Wiener, S. 31.

4) Weintraud, Über Harnsäure im Blute und ihre Bedeutung für die Entstehung der Gicht. Wiener klin. Rundsch. **10**, Nr. 1, 3 (1896). Zit. bei Wiener, S. 31.

5) Ebstein und Nicolaier, Über die Ausscheidung der Harnsäure durch die Niere. Virch. Arch. **143**, 337 (1896).

Verhalten auch das Ergebnis von Versuchen mit Harnsäurevorstufen beeinflussen dürfte, da die im Körper synthetisch gebildete Harnsäure den zersetzenden Einwirkungen im Tierkörper möglicherweise ebenso ausgesetzt ist wie die durch Abbau entstandene.

Neuere Arbeiten in dieser Frage ergaben folgendes: Soetbeer und Ibrahim [1]) haben gefunden, daß beim Menschen per os eingeführte Harnsäure keine Allgemeinveränderungen des Stoffwechsels bewirkt, die eine erhöhte Stickstoffzahl oder erhöhte Harnsäurebildung bedingen, während subcutan einverleibte in der Hauptsache als solche wieder ausgeschieden wird, dabei jedoch als ein Gift auf den Gesamtorganismus einwirkt und eine erhöhte Harnsäurebildung und -ausscheidung bewirkt.

Salkowski [2]) fand bei Fütterungsversuchen mit Harnsäure an Hunden, daß dieselbe zu einem wechselnden Bruchteil resorbiert wird. Von der resorbierten Harnsäure geht ein erheblicher Bruchteil in Allantoin über, ein anderer in Harnstoff. Bei Kaninchen erfolgt eine prompte Resorption. Die Harnsäure geht zum überwiegenden Teile in Harnstoff über, ein kleinerer Teil wird unverändert ausgeschieden, ein kleiner Teil geht vielleicht in Allantoin über.

Da somit in dieser Frage eine volle Übereinstimmung noch nicht erzielt ist, bestimmte ich zunächst, um die größere oder geringere Eignung des Versuchstieres festzustellen, bei Kaninchen, Affen und Menschen die Größe der Harnsäurezerstörung. Die Nahrung war während der Versuchstage genau gleich.

Ich bestimmte im Harn außer dem Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl) und der Harnsäure (nach Ludwig-Salkowski) an einzelnen Tagen auch noch das Allantoin (nach O. Loewi [3]). Ferner prüfte ich den Harn nach den bei Eppinger [4]) und Schloss [5]) gegebenen Vorschriften auf Glyoxylsäure. Das Allantoin wurde nicht als solches bestimmt, sondern aus dem Stickstoffgehalt des Allantoinsilbers berechnet.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind folgende:

---

[1]) Soetbeer und Ibrahim, Über das Schicksal eingeführter Harnsäure im menschlichen Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 1 (1902).

[2]) Salkowski, Über das Verhalten in den Magen eingeführter Harnsäure im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 495 (1902).

[3]) Loewi, Beiträge zur Kenntnis des Nucleïnstoffwechsels. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 44, 1 (1900).

[4]) Eppinger. Über das Verhalten der Glyoxylsäure im Tierkörper. Diese Beiträge 6, 492 (1905).

[5]) Schloss, Über Nachweis und physiologisches Verhalten der Glyoxylsäure. Dissertation Straßburg 1906 u. diese Beiträge 8, 445 (1906).

Versuch Nr. 1. Kaninchen. Zwei Böcke. Gewicht je 2,7 kg. Nahrung: Rüben und Kohl. Jedes der Tiere erhält am zweiten Tage je 1 g Harnsäure in wässeriger Aufschwemmung per Schlundsonde. Der Harn reagierte stets alkalisch.

Tier A.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Verfüttert
1.	440	1,86	0,0315	—
2.	460	1,54	0,0273	1 g Harnsäure
3.	580	1,65	0,0294	—
4.	370	1,16	0,0147	—

Tier B.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Verfüttert
1.	550	1,77	0,0462	—
2.	460	1,35	0,0315	1 g Harnsäure
3.	510	1,42	0,0504	—
4.	320	1,16	0,0126	—

Versuch Nr. 2a. Affe. Männliches Tier. Cercopithecus calitrichus (grüne Meerkatze, Westafrika). Gewicht 6,5 kg. Nahrung: 500 g Kartoffeln, 1 Ei, etwas Zucker, Wasser nach Belieben. Das Tier erhält am 7., 8. und 9. Tage je 0,25 g, am 14. 1 g Harnsäure. Der Harn reagierte alkalisch (nur am 5. Tage schwach sauer).

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Verfüttert
1.	235	1,61	0,015	—	—
2.	180	—	—	—	—
3.	} 320	—	—	—	—
4.		—	—	—	—
5.	165	1,56	0,0105	—	—
6.	150	1,35	0,0153	—	—
7.	195	1,39	0,0166	—	0,25 g Harnsäure
8.	160	1,39	0,0136	—	0,25 „ „
9.	170	1,30	0,0168	—	0,25 „ „
10.	140	1,08	0,0126	—	—
11.	160	1,58	0,0126	—	—
12.	120	1,04	0,0105	—	—
13.	150	1,63	0,0115	0,114	—
14.	360	1,89	0,0230	0,197	1,0 g Harnsäure
15.	170	1,64	0,0115	0,116	—

Versuch Nr. 2b. Affe. Nahrung: 250 g Milch, 60 g Semmel, 1 Ei, etwas Zucker. 100 g Äpfel. Das Tier erhält am 3. und 4 Tage je 1 g Harnsäure. Der Harn reagierte alkalisch. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1010 und 1015.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Verfüttert
1.	270	1,784	0,0158	—
2.	475	2,886	0,0159	—
3.	350	2,362	0,0117	1 g Harnsäure
4.	210	1,846	0,0035	1 „ „
5.	360	2,701	0,0090	—
6.	320	2,168	0,0120	—
7.	380	2,266	0,0111	—
8.	440	2,439	0,0064	—

Versuch Nr. 2c. Affe. Nahrung: 250 g Milch, 60 g Semmel, 1 Ei, etwas Zucker, eine Banane, 100 g Äpfel, 250 g Wasser. Milch und Wasser wurden nicht immer ganz genommen. Das Tier erhält am 7. und 8. Tage je 1,5 g Harnsäure. Der Harn reagierte alkalisch, das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1009 und 1013.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	200	1,35	—	—	—	—
2.	180	1,43	—	—	—	—
3.	210	1,73	—	—	—	—
4.	200	1,16	—	—	—	—
5.	245	1,28	0,0127	—	—	—
6.	180	1,10	0,0143	0,107	negativ	—
7.	200	1,47	0,0109	0,139	—	1,5 g Harnsäure
8.	255	1,61	0,0214	0,157	—	1,5 „ „
9.	230	•1,75	0,0067	0,158	—	—

Versuch Nr. 3. Mensch. Ich stellte die Versuche an mir an. Gewicht 75 kg. Nahrung: 150 g Brot, 45 g Butter, 260 g Hackfleisch, 150 g Schinken, 100 g Kartoffeln, 100 g Spinat, 100 g Äpfel, 2 Eier, 0,4 Liter Zitronenlimonade, 0,5 Liter Bouillon, 0,2 Liter Buttermilch, 0,3 Liter Kakao, 0,2 Liter Kaffee. Ich nahm am 4. und 5. Versuchstage je 3 g Harnsäure. Der Harn war bis auf den ersten Tag sauer. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1025 und 1027.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	1550	23,00	—	—	negativ	—
2.	1560	24,29	—	—	„	—
3.	1460	22,40	0,846	2,207	„	—
4.	1630	23,00	0,773	2,318	„	3 g Harnsäure
5.	1700	24,04	1,067	2,337	„	3 „ „
6.	1740	23,97	0,891	2,069	„	—
7.	1850	23,41	0,994	1,110	„	—

Der Versuch am Kaninchen hatte, wie aus vorstehendem zu ersehen, ein durchaus negatives Ergebnis. Diese Tierart zerstört zugeführte Harnsäure so ausgiebig, daß sie für die vorliegenden Versuche nicht verwandt werden kann. Beim Affen bleiben kleine Harnsäuremengen ohne Einfluß, bei größeren Mengen kommt es zu einer geringen Harnsäurevermehrung. Auch beim Menschen zeigt sich eine merkliche Zunahme der Harnsäureausscheidung.

Versuche über Harnsäuresynthese.

Aus den oben angeführten Gründen stellte ich daher meine Versuche nur am Affen und Menschen an. An Affen verfütterte ich Malonamid, Tartronamid, Tartronsäure, Allantoin und Pseudoharnsäure; an Menschen nur die letztgenannten drei Substanzen.

Ich bestimmte in allen Versuchen den Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl) und die Harnsäure (nach Ludwig-Salkowski), in einzelnen Versuchen auch das Allantoin (nach Loewi), den Harnstoff (nach Mörner-Sjöqvist) und qualitativ die Glyoxylsäure (nach Schloss[1]).

Versuch Nr. 4. Affe. Malonamid. Gewicht 6½ kg. Nahrung wie bei Versuch 2a. Das Tier erhält am 2. Tage zweimal 0,5 g Malonamid. Ich wählte dieses und nicht Malonsäure selbst, um Alkali- und Ammoniakwirkung zu vermeiden, die möglicherweise den Versuch bei Verwendung von Natrium- oder Ammoniummalonat kompliziert hätten. Der Harn reagierte alkalisch.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Harnstoff	Verfüttert
1.	100	1,13	0,0037	1,80	—
2.	95	0,98	0,0025	1,74	2 × 0,5 g Malonamid
3.	75	0,91	0,0050	1,15	—
4.	75	1,13	0,0038	—	—

Versuch Nr. 5. Affe. Tartronamid. Gewicht und Nahrung wie bei Versuch 2a. Das Tier erhält am 3. und 4. Tage je 1 g, am 8. Tage viermal 0,5 g Tartronamid. Der Harn war alkalisch.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Harnstoff	Verfüttert
1.	215	0,72	0,0138	1,20	—
2.	145	0,89	0,0138	1,49	—
3.	335	1,72	0,0184	2,74	1,0 g Tartronamid

[1]) Schloss, a. a. O.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Harnstoff	Verfüttert
4.	160	1,63	0,0138	2,52	1,0 g Tartronamid
5.	190	1,64	0,0113	2,74	—
6.	210	1,27	0,0038	2,12	—
7.	185	1,17	0,0063	1,94	—
8.	205	1,52	0,0045	2,54	4 × 0,5 g Tartronamid
9.	235	1,52	0,0075	2,08	—
10.	270	1,25	0,0063	1,87	—

Versuch Nr. 6. Affe. Tartronsäure. Gewicht wie oben. Nahrung wie bei Versuch 2c. Das Tier erhält am 2. Tage 1 g Tartronsäure (Merck), in Wasser gelöst und neutralisiert, und 1 g Harnstoff. Am 6. Tage als Kontrollversuch 1 g Natrium aceticum und 1 g Harnstoff. Der Harn war stets alkalisch. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1012 und 1016.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	220	1,37	0,0041	0,115	negativ	—
2.	270	2,30	0,0023	0,121	—	1 g Tartronsäure + 1 g Harnstoff
3.	210	1,69	0,0033	—	—	—
4.	200	1,70	0,0157	0,075	—	—
5.	160	1,59	0,0022	0,086	—	—
6.	180	2,08	0,0108	0,111	—	1 g Natrium aceticum + 1 g Harnstoff

Am letzten Versuchstage erkrankte der Affe und ging unter den Erscheinungen einer akuten Enteritis zugrunde. Die Sektion ergab eine geringe Rötung der Darmschleimhaut.

Versuch Nr. 7. Affe. Allantoin. Gewicht wie oben. Nahrung wie bei Versuch Nr. 2c. Das Tier erhält am 2. und 3. Tage je 1,5 g Allantoin (Merck). Der Harn war stets alkalisch. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1012 und 1014.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	220	1,41	0,0096	0,140	negativ	—
2.	275	1,56	0,0069	0,160	„	1,5 g Allantoin
3.	190	1,78	0,0245	0,096[1])	„	1,5 „ „
4.	190	1,52	0,0032	0,168	„	—

Versuch Nr. 8. Affe. Pseudoharnsäure. Gewicht wie oben. Nahrung: 200 g Milch, 1 Ei, etwas Zucker, 160 g Semmel, 70 g Äpfel, Wasser nach Belieben. Das Tier erhält am 4. und 5. Tage je 1 g Pseudoharnsäure (von Boehringer u. Söhne, Mannheim, freundlichst zur Verfügung ge-

[1]) Ungenau.

stellt). Der Harn war stets alkalisch. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1011 und 1018.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Harnstoff	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	230	1,83	0,0072	4,45	negativ	—
2.	250	2,01	0,0042	3,76	„	—
3.	192	2,17	0,0153	4,07	„	—
4.	370	2,61	0,0186	4,83	„	1 g Pseudoharnsäure
5.	345	2,36	0,0043	4,30	„	1 „ „
6.	380	2,07	0,0032	3,76	„	—
7.	340	2,36	0,0128	2,14	„	—

Versuch Nr. 9. Mensch. Tartronsäure. Gewicht wie oben. Nahrung wie bei Versuch Nr. 3. Ich nahm am 3. Tage 9 g Tartronsäure (Merck), in Wasser gelöst und neutralisiert, und 10 g Harnstoff, in Wasser gelöst. Am 7. Tage als Kontrollversuch 9 g Natrium aceticum und 10 g Harnstoff. Der Harn reagierte am 5. und 6. Tage sauer, sonst alkalisch. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1023 und 1027.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	1700	20,13	0,66	—	negativ	—
2.	1620	21,23	0,67	—	„	—
3.	1620	23,86	0,47	1,97	„	9 g Tartronsäure + 10 g Harnstoff
4.	1940	22,76	0,64	2,40	„	—
5.	1550	22,61	0,48	—	„	—
6.	1640	22,68	0,26	2,21	„	—
7.	1710	25,18	0,50	2,34	„	9 g Natrium aceticum + 10 g Harnstoff
8.	1770	23,04	0,64	—	„	—

Versuch Nr. 10. Mensch. Allantoin. Gewicht wie oben. Nahrung wie bei Versuch Nr. 3. Ich nahm am 2. und 3. Tage je 3 g Allantoin (Merck). Der Harn reagierte am 1. und 4. Tage alkalisch, sonst sauer. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1024 und 1025.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Allantoin	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	1670	19,74	0,51	0,639	negativ	—
2.	1750	22,88	0,60	1,051	„	3 g Allantoin
3.	1600	23,52	0,56	1,213	„	3 „ „
4.	1900	25,00	0,84	1,749	„	—

Versuch Nr. 11. Mensch. Pseudoharnsäure. Gewicht wie oben. Nahrung: 150 g Brot, 100 g Butter, 150 g Hackfleisch, 150 g Schinken, 150 g Kartoffeln, 150 g Spinat, 3 Eier, 0,75 Liter Bouillon, 0,5 Liter Kakao, 80 g

Äpfel, 0,75 Liter Wasser. Ich nahm am 4. Tage 1,5 g, am 5. Tage 2,5 g Pseudoharnsäure. Der Harn reagierte stets sauer. Das spezifische Gewicht schwankte zwischen 1017 und 1025.

Tag	Harnmenge ccm	Gesamt-Stickstoff	Gesamt-Harnsäure	Gesamt-Harnstoff	Glyoxylsäure	Verfüttert
1.	2115	21,2	—	—	negativ	—
2.	2060	23,8	1,23	43,8	„	—
3.	2010	24,6	1,00	49,1	„	—
4.	1850	24,03	0,74	45,5	„	1,5 g Pseudoharnsäure
5.	1850	25,0	0,88	46,7	„	2,5 „ „
6.	1760	24,9	0,91	47,7	„	—
7.	1980	26,16	0,89	50,6	„	—
8.	2200	23,40	0,79	44,5	„	—
9.	2250	23,05	0,89	43,8	„	—
10.	2260	24,86	—	—	„	—

Schlußbemerkungen.

Die Ergebnisse meiner Fütterungsversuche am Affen und Menschen haben, wie aus obigen Tabellen hervorgeht, gezeigt, daß nach Zufuhr von Malonamid, Tartronamid und Tartronsäure eine merkliche Vermehrung der Harnsäureausscheidung nicht nachzuweisen ist. Selbst bei Verfütterung der der Harnsäure so nahestehenden Pseudoharnsäure wurde sie vermißt. Nur im Allantoinversuch Nr. 7 zeigt sich am 3. Tage eine hohe Harnsäurezahl, der aber am 4. Tage eine abnorm niedrige folgt.

Aus den Versuchen ist somit nicht zu entnehmen, daß es eine Harnsäuresynthese beim Säugetier gibt. Vielmehr ist das Ergebnis eher geeignet, die Annahme einer solchen überhaupt zweifelhaft zu machen.

Im Hinblick auf die entgegenstehenden positiven Befunde Wieners, der bei Darreichung von Dialursäure, Milchsäure und Malonsäure beim Menschen eine Vermehrung der Harnsäure fand, die er bei Zufuhr von Natriumacetat vermißte, muß darauf hingewiesen werden, daß Wiener allzu großes Gewicht auf geringe Zunahmen der Harnsäurezahl gelegt hat. So betrug bei einem seiner Versuche die Harnsäure im Mittel an Normaltagen 0,5377 g, an denjenigen Tagen, an denen z. B. Dialursäure gegeben worden war, 0,6082 g. Die entsprechenden Zahlen für milchsaures Natron sind 0,4832 und 0,5449. Es handelt sich dabei also immer nur um Differenzen von 0,06 bis 0,07 g Harnsäure. Solche Differenzen finden sich, wenn man die Zahlen Wieners genauer prüft, aber auch an einzelnen Normaltagen.

Um eine Synthese der Harnsäure im Organismus genügend zu beweisen, wäre wohl bei der Darreichung der physiologischen Vorstufen ein viel stärkerer Ausschlag der Harnsäurezahl erforderlich.

Durch obige Versuche ist es noch unwahrscheinlicher geworden, als es ohnehin war, daß die pathologische Harnsäureanhäufung bei gewissen Krankheitszuständen (und ich habe hier in erster Linie die Gicht im Auge) von einer vermehrten synthetischen Bildung der Harnsäure abhängig ist. Sie könnte somit ihre Ursache nur in einer vermehrten oxydativen Bildung aus Purinkörpern haben. Nun erkrankt aber von Menschen, die sich in gleichen Lebensbedingungen befinden und etwa gleich viel Purinkörper aufnehmen, immer nur ein kleiner Teil an Gicht. Danach erscheint es überhaupt ganz unwahrscheinlich, daß vermehrte Harnsäurebildung die Ursache der pathologischen Harnsäureanhäufung ist, und die Vorstellung, daß es sich dabei, sei es um eine Verminderung des Harnsäureabbaues, sei es um eine Hemmung der Ausscheidung durch die Nieren handelt, gewinnt dementsprechend an Gewicht.

XXI.

Der Glykogengehalt der menschlichen Muskeln und seine Abnahme nach dem Tode.

Von Dr. **Giuseppe Moscati,**
Assistenten des Instituts.

Aus dem Institut für physiologische Chemie (Direktor Prof. Malerba) und dem Ospedale Incurabili in Neapel.

Methodik der Untersuchung des Menschenmuskels. — Quantitative Glykogenbestimmungen. — Abnahme des Glykogengehalts bei gewöhnlicher und erhöhter Temperatur. — Einfluß der Antiseptica. — Glykogengehalt fettig degenerierter und nekrotischer Muskeln. — Allgemeine Betrachtungen. — Das Zustandekommen der Glykogenabnahme. — Nutzanwendung für die gerichtliche Medizin.

Im allgemeinen ist bisher die Beziehung des Glykogens zum tierischen Stoffwechsel nur in corpore vili untersucht worden, und zwar aus einem naheliegenden Grunde. Während das rein dargestellte Glykogen an sich nicht sehr veränderlich ist, unterliegt es, wenn es nach dem Tode mit den Geweben in Berührung bleibt, schon nach wenigen Minuten einer rasch vorschreitenden Veränderung. Daher ist es üblich, bei einschlägigen physiologischen Versuchen mit im wahren Sinne des Wortes lebenden Organen zu arbeiten, indem man sie, kaum dem Tiere entnommen, sofort in kochendes Wasser wirft oder sonst unter Bedingungen bringt, die ein sofortiges Absterben der Zellen zur Folge haben und so einer weiteren Veränderung des Glykogens vorbeugen. Die Angaben über den Glykogengehalt menschlicher Gewebe, die an der Leiche ermittelt sind, können daher keine Gültigkeit für die lebenden Organe beanspruchen.

Danach erscheinen Untersuchungen über Glykogen beim Menschen, wenn nicht besondere Umstände hinzukommen, einfach undurchführbar. In der Tat liegen in dieser Richtung nur Versuche von Lambling[1]) vor, der den Glykogengehalt der Organe

[1]) E. Lambling, Dosage de matière glycogène dans les organes d'un supplicié (Compt. rend. de la Soc. d. Biol. 1885, S. 385).

eines Hingerichteten zwei Stunden nach dem Tode quantitativ bestimmte. Aber Lambling selbst machte, als er seine Versuche der Societé de Biologie mitteilte, darauf aufmerksam, daß die gefundenen Zahlen nur mit Vorbehalt zu verwerten seien, da zwei Stunden nach dem Tode bereits zu einem merklichen Glykogenverlust mehr als hinreichten.

1. Methodik.

Untersuchungen über das Muskelglykogen der Tiere liegen in überaus großer Zahl vor, und wenn ich mich an den gewöhnlichen Weg, den Tierversuch, gehalten hätte, wäre ich kaum in der Lage, mehr als die Bestätigung der einen oder der anderen schon ausgesprochenen Meinung beizubringen. Meine Bemühungen waren daher direkt auf das Glykogen des Menschenmuskels gerichtet. Dabei war es notwendig, unter möglichst der Norm entsprechenden Bedingungen zu arbeiten, so daß selbst von der Verwendung ganz frischer Leichen — abgesehen von der Unzulässigkeit derselben — schon darum Abstand genommen werden mußte, weil hier in der Regel Krankheit und Agonie die physiologischen Verhältnisse in nicht zu übersehender Weise verändert haben können.

Die Umgehung dieser Schwierigkeiten gelang mir mit Hilfe eines Auskunftsmittels, das auch sonst bei ähnlichen Untersuchungen von Nutzen sein dürfte. Ich verwendete vom Chirurgen wegen verschiedener Erkrankungen — Entzündungen, Neubildungen, Traumen — amputierte oder exartikulierte Gliedmaßen.

Während meiner Dienstzeit im Ospedale Incurabili wohnte ich mit gütiger Erlaubnis der leitenden Chirurgen[1]) den Operationen bei. Sobald die Extremität durch Messer oder Säge entfernt war, entnahm ich ihr eine bestimmte Menge Muskeln (das Gewicht wurde durch Differenz ermittelt) und brachte sie, während sie sich noch kontrahierten und unter der Pinzette zuckten, in kochende Kalilauge. Der Rest der Muskeln wurde später im physiologisch-chemischen Institut weiter untersucht. In einigen Fällen benutzte ich Stücke der Brustmuskulatur, die bei Mammaoperationen mitentfernt worden waren. Dem Direktor des physiologisch-chemischen Instituts, Herrn Prof. Malerba, bin ich für die mir gütigst gewährte Unterstützung mit Rat und Tat zum lebhaftesten Danke verpflichtet.

[1]) Ich spreche den klinischen Chirurgen der vereinigten Krankenanstalten für die mir geleistete wertvolle Beihilfe meinen besten Dank aus, insbesondere den Herren Proff. Ferraioli, Buonomo, Virdia, Leccetti, Lupò und Liguori, die sich für meine Untersuchungen interessierten, und Herrn Dr. Gambardella, der mir viel Untersuchungsmaterial zukommen ließ.

Zur Gewinnung des Glykogens diente mir Pflügers Verfahren, nur war ich mit Rücksicht auf die Knappheit des kostbaren Materials genötigt, die Gewichtsverhältnisse erheblich niedriger zu wählen. Die Bestimmung geschah nach Fehling oder Allihn, oder mit meinem Gärungsapparat[1]).

Da bei den chirurgischen Operationen, sei es wegen der Natur der Erkrankung, sei es aus technischen Gründen, regelmäßig erhebliche Mengen gesunden Gewebes mit entfernt werden, stand mir stets eine gewisse Menge normaler Muskeln zur Verfügung. Es könnte das Bedenken erhoben werden, daß die zur Operation führende Erkrankung den Glykogengehalt beeinflußt haben könne. Ich habe die Muskelproben daher entfernt vom Krankheitsherd entnommen. Es sei aber gleich bemerkt, daß meine Resultate sehr nahe übereinstimmend ausgefallen sind, obgleich die Operationen auf Grund sehr verschiedener Indikationen vorgenommen worden waren.

Da die Operationen stets innerhalb sehr kurzer Zeit ausgeführt wurden, so daß die Kranken nicht viel Chloroform aufgenommen haben konnten, so möchte ich den etwaigen Einfluß der Chloroformnarkose für eine zu vernachlässigende Fehlerquelle ansehen. Jedenfalls kann dem Chloroform, das die Muskeln zur Erschlaffung bringt, im Gegensatz zu manchen anderen chemischen Stoffen bei nicht zu langer Dauer der Einwirkung kein Einfluß auf den Glykogengehalt zugeschrieben werden.

Die Ernährung hat bekanntlich einen großen Einfluß auf den Glykogengehalt der Muskeln. Glücklicherweise waren in meinen Versuchen die Ernährungsbedingungen sehr annähernd gleich, da die Kranken im Hospital die gleiche ruhige Lebensweise führten und, Männer wie Frauen, die gleiche Kost erhielten.

2. Der Glykogengehalt der Menschenmuskeln.

Während man sonst in der Physiologie des Menschen vielfach gezwungen ist, die im Tierversuch ermittelten Daten durch einen Analogieschluß auf den Menschen zu übertragen, bin ich auf Grund der beschriebenen Versuchsanordnung in der Lage, präzise, direkt ermittelte Zahlen für den Glykogengehalt des menschlichen Muskels zu geben. Er beträgt im Mittel 0,4 Proz. des frischen Muskels. Dabei sind die distal gelegenen Muskeln etwas glykogenärmer, und der Glykogengehalt steigt gegen den Rumpf zu etwas an, und zwar gilt dies für die obere, wie für die untere Extremität.

[1]) G. Moscati, Un nouvel appareil pour la détermination des sucres. Archives de physiol. 1905.

Die Muskeln der Frauen enthalten eine Spur weniger Glykogen als jene der Männer. Doch gilt dies nur für den Vergleich homologer Muskeln. Diese Verschiedenheiten können auch in Leichen oder doch einige Stunden nach dem Tode gefunden werden, vorausgesetzt, daß es sich um Individuen handelt, die unter den gleichen Bedingungen in bezug auf Ernährung, Muskelarbeit usw. standen. In Wirklichkeit sind die Muskeln von gut genährten Individuen, Männern oder Frauen, glykogenreicher als jene von mageren und heruntergekommenen.

Die Muskeln des Fußes, des Unterschenkels, der Hand und des Vorderarmes enthalten 0,305 bis 0,385 Proz., jene des Oberarmes 0,55 Proz., des Oberschenkels 0,58 bis 0,88 Proz. Bei sehr kräftigen Männern kann schon der Prozentgehalt der Fußmuskeln 0,747 Proz. betragen, er steigt dann in der Beinmuskulatur gegen den Rumpf zu nur wenig an.

3. Die postmortale Glykogenabnahme.

Bei Lufttemperatur. Die an den amputierten Gliedmaßen zurückgelassenen Muskeln wurden fein zerschnitten, gemischt und in gewogenen Mengen bei Lufttemperatur teils sich selbst überlassen, teils nach Zusatz eines Antisepticums (Toluol oder Chloroform) in verschlossenen Gefäßen aufbewahrt. Die Versuche wurden bei Sommer- und bei Wintertemperatur ausgeführt.

Zunächst will ich über die auf eine mittlere Temperatur von 15° bezüglichen Versuche berichten. (Doch sei gleich bemerkt, daß sich bei einer Temperatur von 24 bis 25° dasselbe Verhalten oder höchstens eine ganz leichte Beschleunigung ergeben hat.)

Der Anfangswert für den Glykogengehalt sinkt langsam ab, eine Stunde nach dem Absterben verändern sich nur die dritte oder zweite Dezimale, nach 24 bis 48 Stunden hat auch die erste Dezimale etwa um die Einheit abgenommen, und die Kurve sinkt langsam, vorausgesetzt, daß Glykogen überhaupt noch in bestimmbarer Menge vorhanden ist, bis zur 69. bis 72. Stunde ab. Bei Beginn der Fäulnis ist noch Glykogen nachweisbar, nach 96 bis 100 Stunden ist auch dieser Rest verschwunden.

Die Versuche sind sämtlich beweiskräftig. Ich teile davon nachstehenden mit.

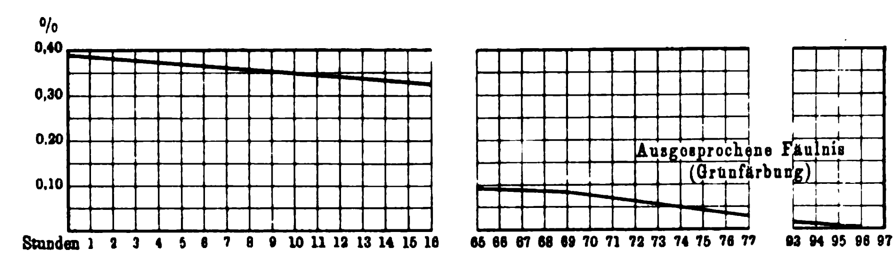
Muskeln vom Unterschenkel, amputiert am 14. Mai 1906 im oberen Drittel wegen Gangrän des Fußes bei einem 60jährigen Mann (Prof. Virdia). Glykogengehalt sofort: 0,345 Proz., nach einer Stunde: 0,332 Proz., nach 18 Std.: 0,32 Proz., nach 26 Std.: 0,25 Proz., nach 72 Std.: 0,09 Proz. Später

kommt es zu ausgesprochener Fäulnis, doch werden noch bestimmbare Spuren (0,01 Proz.) gefunden, die erst mit der 96. Stunde verschwinden.

Bei Wintertemperatur, auch wenn das Thermometer auf 0° sinkt, bleibt die Kurve des Glykogenschwundes die gleiche, nur verzögert sich der Zeitpunkt des endgültigen Verschwindens bis zu 169 Stunden. Es liegen mir sowohl Untersuchungen an der unteren als auch an der oberen Extremität vor. Nachstehend ein Beleg.

Muskulatur vom linken Unterschenkel, exartikuliert am 30. November wegen einer Knochenmarkgeschwulst der Tibia bei einem 40jährigen Mann (Prof. Liguori). Die Lufttemperatur am Tage der Operation und an den nächstfolgenden Tagen um 0°.

Glykogengehalt der frischen Muskeln: 0,3290 Proz., nach 1 Std.: 0,3275 Proz., nach 48 Std.: 0,297 Proz., nach 93 Std.: (stinkende Fäulnis, aber noch keine Grünfärbung) 0,165 Proz., nach 141 Std.: 0,025 Proz., nach 165 Std.: Kaum nachweisbare Spuren.



Einfluß der Antiseptica. Chloroform- oder Toluolzusatz ändern nichts am Verlauf des Glykogenschwundes, nur bleibt das Glykogen etwas (um 24 bis 48 Stunden) länger nachweisbar, und die Kurve zeigt nicht die Beschleunigung des Abfalls, der bei sich selbst überlassenen Muskeln infolge der Fäulnis eintritt.

Im Thermostaten bei 37° verschwindet das Glykogen rapid. Eine Probe von 50 g war in 7 bis 10 Stunden glykogenfrei.

Fettig degenerierte Muskeln, die gelegentlich an amputierten Gliedmaßen angetroffen wurden, zeigten, wie ich der Seltenheit des Befundes wegen mitteilen will, noch Glykogengehalt (Unterschenkelamputation am 6. April 1906 ausgeführt von Prof. Buonomo bei einem 45jährigen Mann wegen Elephantiasis und Hauttuberkulose). Offenbar bleibt das Glykogen erhalten, solange unveränderte Muskelsubstanz da ist.

Ebenso habe ich Glykogen in Muskeln angetroffen, die in den gangränösen Prozeß einbezogen und auch zum Teil fettig degeneriert waren. (So am Unterschenkel eines Mannes von mittleren

Jahren, wo die Amputation von Prof. Ferraioli wegen Tuberkulose und konsekutiver Gangrän vorgenommen wurde. Es ergab sich ein Prozentgehalt von 0,208.)

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Takácz[1]), Prausnitz[2]) u. a. stehen meine Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Angaben von Külz und Aducco. Während die ersteren Beobachter ein rasches Verschwinden des Muskelglykogens annehmen, hat Külz[3]) nachgewiesen, daß die Muskeln selbst 26 Stunden nach dem Tode erhebliche Mengen Glykogen enthalten. Aducco fand es in Hundemuskeln noch 168 oder 264 Stunden nach dem Tode und hebt hervor, daß postmortal das Glykogen der Leber stärker als jenes der Muskeln angegriffen wird.

Meine Beobachtungen stehen auch mit jenen von Boehm[4]) im Einklang, der den Einfluß der Totenstarre auf den Glykogenschwund bei Fernhaltung der Fäulnis leugnet, während Werther[5]) eine rapide Abnahme mit Eintritt der Starre festgestellt zu haben glaubt. Aus meinen Versuchen geht eine sehr allmähliche Abnahme hervor, die gleichmäßig bis zum Eintritt der Fäulnis fortschreitet und erst, wenn diese ausgesprochen ist, einen rascheren Verlauf nimmt.

Der Glykogenverlust ist somit von der Totenstarre unabhängig; vielleicht darf man sagen, daß die Glykogenzersetzung und die Starre durch dieselbe Ursache bedingt sind. Daß dagegen die Bakterienentwickelung bei der Fäulnis auf den Glykogengehalt Einfluß hat, steht völlig fest.

4. Zustandekommen der Glykogenabnahme.

Ist das Zustandekommen der Glykogenabnahme durch eine Diastase bedingt? Verschiedene Beobachter bejahen diese Frage. In einer Arbeit, die erschien, als meine Untersuchungen schon längere Zeit im Gange waren, spricht sich neuerdings Kisch[6]) zu-

---

[1]) Takácz, Beitrag zur Lehre von der Oxydation im Organismus. Zeitschr. f. physiol. Chemie 2, 372 (1878).

[2]) Prausnitz, Über den zeitlichen Ablauf der Ablagerung und des Schwindens des Glykogens. Zeitschr. f. Biol. 26, 377 (1890).

[3]) E. Külz, Zum Verhalten des Glykogens in der Leber und den Muskeln nach dem Tode. Pflügers Arch. 24, 57 (1881).

[4]) Boehm, Über das Verhalten des Glykogens und der Milchsäure im Muskelfleisch usw. Pflügers Archiv 23, 44 (1880) u. 46, 256 (1869).

[5]) M. Werther, Über die Milchsäurebildung und den Glykogenverbrauch in quergestreiften Muskeln usw. Pflügers Archiv 46, 63, 1889.

[6]) Kisch, Über den postmortalen Glykogenschwund und seine Abhängigkeit von physiologischen Bedingungen. Diese Beiträge 8, 210. Juni 1906.

gunsten dieser Vorstellung aus. Er fügte zu Muskelbrei unter antiseptischen Bedingungen (Toluolzusatz) Glykogen hinzu und sah es bald verschwinden. Vergleicht man aber den Ablauf der Glykogenabnahme im Muskel einerseits, in der Leber und der Placenta andererseits, so ergibt sich ein augenfälliger Unterschied. In der Leber und der Placenta findet sich eine Periode steilen Absinkens, der eine Periode weiterer, aber minder ausgesprochener Abnahme folgt, während das Absinken im Muskel langsam und unauffällig erfolgt. Man könnte daran denken, daß diese Trägheit des Absinkens mit der postmortalen Säuerung der Muskeln zusammenhängt. Kisch mißt indes der Acidität keine Bedeutung zu und mit Recht, da die Glykogenspaltung trotz zunehmend saurer Reaktion fortschreitet.

In einer Untersuchung über die Placenta, die gleichzeitig mit vorliegender Arbeit erscheint, führe ich neuerlich den Gedanken aus, der schon in meiner Arbeit über Injektion von Stärkekleister ausgesprochen ist, nämlich, daß der Glykogenschwund nicht so sehr von im Leben vorgebildeter Diastase abhänge, als vielmehr von beim Absterben gebildeten Stoffen (die ja auch fermentartig wirken können), oder wenigstens von (eiweißähnlichen) Stoffen, die im Leben von den der Fermentwirkung zugänglichen Substanzen streng geschieden sind und einer Regulation ihrer Einwirkung auf diese unterliegen. Die parenchymatösen zellenreicheren Organe mit ihrem hohen Protoplasmagehalt (Leber, Placenta) müßten dann diese Stoffe in größerer Menge liefern als der Muskel.

Auch Demant[1]) spricht anläßlich der postmortalen Glykogenabnahme von einem Ferment, das sich in den toten Muskeln findet, und dessen Wirkung er in seinen Versuchen mit Phenol zu paralysieren suchte. Jedenfalls muß die Muskeldiastase, auch wenn man ihre Präexistenz im lebenden Gewebe annimmt, von der Diastase der Leber und Placenta verschieden sein.

Der Muskel ist das beste Beispiel der postmortal eintretenden einfachen rein chemischen Vorgänge. Durch diese Veränderungen und die Verschiebung der physico-chemischen Beziehungen zwischen Zellen und Intercellularflüssigkeit kann es dazu kommen, daß, sobald die hindernden Momente gefallen sind, die Fermente und die von ihnen angreifbaren Stoffe sich vermischen, wobei anzunehmen ist, daß die Fermente im Muskel nur spärlich oder doch bei gewöhnlicher Temperatur nur wenig wirksam sind. Die Totenstarre

[1]) Demant, Beitrag zur Lehre über die Zersetzung des Glykogens in den Muskeln. Zeitschr. f. physiol. Chemie 3, 200 (1879).

ist der auffälligste Ausdruck dieser Veränderungen, die Glykogenabnahme kann als ein zweiter Hinweis auf die erfolgte Zerstörung der Muskelstruktur angesehen werden. Ich habe diese Auffassung in meiner Arbeit über die Placenta ausführlicher begründet.

5. Der Glykogengehalt der Muskeln vom Standpunkte der gerichtlichen Medizin.

Die vorliegenden Erfahrungen können in einem gewissen Maße für die forensische Praxis (Thanatologie) von Nutzen sein. Da ich gefunden habe, daß in den ersten 24 Stunden nach dem Tode nur wenig Glykogen verschwindet, liegt hier ein Arbeitsgebiet vor, das bei Benutzung von Leichenmuskeln eine weitere Vertiefung gestattet. Jedenfalls könnte dieses Kennzeichen im Zusammenhang mit den mannigfaltigen Kriterien, die zur Bestimmung der Zeit des eingetretenen Todes dienen, von Nutzen sein, namentlich wenn bereits Fäulnis eingetreten ist und die Untersuchung, falls noch Glykogen da ist, die oben angeführte Abfallskurve ergibt. Innerhalb der gebotenen Schranken könnte dieses Hilfsmittel in gerichtlichen Fällen einen wertvollen Anhaltspunkt gewähren.

6. Schlußfolgerungen.

1. Die menschlichen Extremitätenmuskeln enthalten im Mittel 0,4 Proz. Glykogen, die proximalen mehr als die distal gelegenen.

2. Bei 15° nimmt der Glykogengehalt langsam und kontinuierlich ab; ist (um die 69. Stunde) ausgesprochene Fäulnis eingetreten, so erfolgt rascherer Abfall, der (um die 96. bis 100. Stunde) zum völligen Verschwinden führt.

3. Bei 0° erfolgt die Abnahme etwa halb so rasch.

4. Zusatz von Antisepticis verzögert das Verschwinden des Glykogens um 1 bis 2 Stunden, verhindert es aber nicht.

5. Der Glykogenschwund in den Muskeln ist vermutlich der Ausdruck eines postmortalen chemischen Prozesses, ebenso wie die Totenstarre.

6. Der zeitliche Ablauf des Glykogenschwundes dürfte unter Umständen namentlich im Zusammenhang mit anderen Kriterien in forensischen Fällen zur Bestimmung des Zeitpunktes des Todes von Wert sein.

XXII.

Über die Konstitution der Inosinsäure und die Muskelpentose[1]).

Von **Friedrich Bauer.**

Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.

Die Inosinsäure wurde von Liebig entdeckt. In seiner Arbeit „Über die Bestandteile der Flüssigkeiten des Fleisches“ [2]), in der er hauptsächlich auf die Darstellung des Kreatins und der Milchsäure ausging, teilte er Näheres über Darstellung und Eigenschaften der neuen Säure mit.

Er benutzte verschiedene Fleischsorten; 5 kg des möglichst frischen, fein zerhackten Fleisches wurden mit 10 Liter Wasser in verschiedenen Portionen verrührt und so kalt extrahiert, dann wurde die Flüssigkeit von den festen Bestandteilen möglichst vollständig abgepreßt. Die vereinigten Auszüge wurden so lange gekocht, bis alle gerinnbaren Stoffe und der Farbstoff vollständig abgeschieden waren. Die abfiltrierte Fleischbrühe war bei Benutzung von Wildbret und Hühnerfleisch vollständig klar und daher für die weiteren Untersuchungen am geeignetsten.

Die sauer reagierende Lösung wurde mit konzentrierter Lösung von Barythydrat so lange versetzt, als noch eine Trübung erfolgte. Dadurch wurden phosphorsaurer Baryt und phosphorsaure Magnesia ausgefällt; der Niederschlag sollte alle Phosphorsäure der Fleischflüssigkeit enthalten.

Das Filtrat wurde bei nicht zu hoher Temperatur vorsichtig bis auf $^1/_{20}$ des Volums eingedampft und der Sirup in flachen Schalen stehen gelassen. Liebig legt großen Wert darauf, daß die Temperatur dabei 50 bis 60° nicht überschreitet. Dabei kristallisiert Kreatin aus. Nach vollständiger Ausscheidung des Kreatins wurde es von der Flüssigkeit getrennt, diese noch weiter abgedampft und dann allmählich mit kleinen Portionen Alkohol bis zu milchiger Trübung versetzt; das sich bildende Kristallgemenge wurde gesammelt und mit Alkohol ausgewaschen.

Der weitaus größte Teil dieser Kristalle war das Kali- und Barytsalz der „Inosinsäure“. Duch Auflösen der Kristalle in heißem Wasser und Zusatz von Baryumchlorid erhielt er nach dem Erkalten alle Inosinsäure als Barytsalz, das nach zweimaligem Umkristallisieren vollständig rein war.

---

[1]) Der medizinischen Fakultät in Straßburg am 26. Juli 1907 als Dissertation vorgelegt.

[2]) Ann. d. Chem. u. Pharm. 62, 257.

Aus dem Barytsalz konnte die reine Säure durch Ausfällung des Baryts mit verdünnter Schwefelsäure leicht dargestellt werden. Sie kristallisierte nicht, wurde aber durch Alkohol als weißer, amorpher Niederschlag beinahe vollständig ausgefällt.

Von Liebig wurden verschiedene Salze der Inosinsäure dargestellt. Am genauesten beschrieben ist das Barytsalz. Es ist in kaltem Wasser schwer, in heißem leichter löslich, unlöslich in Alkohol. 1000 Teile Wasser von 16° lösen 2,5 Teile inosinsaures Baryum. Beim Erhitzen der wässerigen Lösung über 70° scheidet sich ein Teil des Salzes als harzähnliche Masse aus. Die Kristalle sind längliche vierseitige Blättchen. Es verlor beim Erhitzen auf 100° 19,07 Proz. Wasser, was, wie Liebig bemerkt, für 7 Atome Kristallwasser nicht ganz stimmt.

Auch das Kali- und Natronsalz wurden kristallisiert erhalten, während das Kupfer- und Silbersalz amorph ausfielen.

Liebig fand für das Barytsalz die Zusammensetzung:

$$C_{10}H_{12}N_4O_{11}Ba$$

und stellte für die reine Säure die Formel $C_{10}H_{14}N_4O_{11}$ auf.

Was die Konstitution der Inosinsäure betrifft, so nimmt Liebig eine „gepaarte Säure" an und denkt dabei an eine Beteiligung von Essigsäure, Oxalsäure und Harnstoff.

Späteren Untersuchern gelang es durchaus nicht immer, die Liebigsche Säure wiederzufinden. So vermißte sie Gregory[1]) im Ochsenherzenfleisch, Taubenfleisch, Rochenfleisch und Kabeljaufleisch, obgleich er sich der Liebigschen Methode bediente. Er läßt es dahingestellt, ob keine vorhanden war, oder ob sie sich während des Abdampfens zersetzt hatte.

Auch Schlossberger[2]) konnte im Menschenfleisch mit Hilfe der Liebigschen Methode keine Inosinsäure nachweisen.

Limpricht[3]) stellte zwar aus Fleischflüssigkeit von Heringen und Hornfischen kristallisierende Barytsalze von zwei Säuren dar, deren Eigenschaften genau denen des inosinsauren Baryums entsprachen, denen er aber auf Grund seiner Analysen die Formeln $C_{13}H_{17}BaN_5O_{14}$ und $C_{10}H_{14}BaN_4O_{11}$ zuschreibt.

Hingegen konnten Gregory und Meissner die Inosinsäure im Hühnerfleisch wiederfinden und quantitativ bestimmen.

Auch Creite[4]) fand die Säure in vielen Fleischsorten und bestimmte darin ihre Mengenverhältnisse. Creite fand, daß Entenfleisch den größten Gehalt an Inosinsäure aufweist.

---

1) Ann. d. Chem. u. Pharm. **64**, 106.
2) Ebenda **66**, 82.
3) Ebenda **133**, 301.
4) Zeitschrift für rationelle Medizin **36**, 195.

Einen entschiedenen Fortschritt erfuhr die Kenntnis der Inosinsäure durch Haiser[1]). Haiser arbeitete zunächst eine neue Darstellungsmethode aus.

Als Ausgangsmaterial diente ihm das Liebigsche Fleischextrakt.

Je 1 kg Extrakt wurde mit großen Mengen absoluten Alkohols ausgezogen, und die Extraktion 3 bis 4 mal wiederholt; dabei gehen Kreatin, Milchsäure, Extraktivstoffe usw. in den Alkohol; der Rückstand enthält dann außer mineralischen Phosphaten, Chloriden, leimartigen Substanzen usw. fast die gesamte Menge der inosinsauren Salze. Diese Masse wird in mäßig warmem Wasser aufgelöst (etwa 2 bis 3 Liter) und filtriert; das Filtrat wird mit einer kaltgesättigten Lösung von Ätzbaryt behandelt, wodurch die Phosphate und Sulfate ausgefällt werden; ein Überschuß von Baryt muß durchaus vermieden werden, weil sonst ein basisches Barytsalz der Säure entsteht, welches in Wasser unlöslich ist. Das Filtrat, welches alkalisch reagiert, wird mit verdünnter Salpetersäure genau neutralisiert und hierauf mit einer konzentrierten Lösung von Silbernitrat so lange versetzt, als noch etwas ausfällt. Der Niederschlag wird abfiltriert und rasch ausgewaschen; dann mit Schwefelwasserstoff zersetzt und der überschüssige Schwefelwasserstoff beseitigt. Dann wird die Masse mit Baryumcarbonat versetzt und einmal aufgekocht. Es wird dann vom Schwefelsilber und überschüssigen Carbonat abfiltriert und so eine neutrale reine Lösung erhalten, welche auf dem Wasserbade bei 80° auf etwa 250 ccm eingeengt wird; danach läßt man stehen, und das inosinsaure Baryum kristallisiert allmählich aus. Die Kristalle werden mit Tierkohle entfärbt und umkristallisiert.

Nach diesem Verfahren soll man aus 1 kg Extrakt etwa 5 bis 7 g reines Barytsalz erhalten.

Die Analysen ergaben überraschenderweise, daß die Substanz Phosphor enthält, welchen Liebig vollständig übersehen hatte. Danach kommt der Säure die Formel $C_{10}H_{13}N_4PO_8$ zu. Im übrigen aber stimmten die Eigenschaften und die Zusammensetzung der Haiserschen Säure so gut zu Liebigs Angaben, daß gar kein Zweifel besteht, daß es sich um dieselbe Substanz handelte.

Das lufttrockene Barytsalz enthält $7^1/_2$ Mol. Kristallwasser; davon entweichen $6^1/_2$ Mol. beim Erhitzen auf 100°, das letzte Molekül erst bei Trocknung im Vakuum bei 100°. Beim Erhitzen über 100° zersetzt sich die Substanz sehr rasch.

Haiser stellte zur Identifizierung auch aus Enten-, Gänse- und Kaninchenfleisch das inosinsaure Baryum dar und erhielt durch Analysen Zahlen, die mit der Zusammensetzung des aus Fleischextrakt gewonnenen Salzes übereinstimmten. Außerdem hat er das basische Baryumsalz und das Calciumsalz analysiert und durchaus zu der obigen Formel passende Zahlen erhalten.

Er erlangte ferner durch Hydrolyse wichtige Aufschlüsse über die Konstitution der Säure. Das Barytsalz wurde mit der be-

[1]) Monatshefte für Chemie 16, 190.

rechneten Menge Schwefelsäure in wässeriger Lösung zerlegt, und die Lösung 3 Stunden gekocht; sie wurde dann verdünnt, mit Baryumcarbonat neutralisiert und das Filtrat im Vakuum bei niederer Temperatur eingeengt; Haiser erhielt so einen zum Teil kristallinischen Rückstand, der durch Extraktion mit absolutem Alkohol in zwei Fraktionen getrennt wurde.

Der in Alkohol lösliche Teil wurde kristallinisch erhalten und durch Analyse der freien Base wie auch des Hydrochlorats, ferner durch charakteristische qualitative Reaktionen als Sarkin erkannt.

Von dem in Alkohol unlöslichen Teil war nur ein Teil in Wasser löslich; das Unlösliche erwies sich als reines Baryumphosphat. Aus dem Filtrat wurden durch fraktioniertes Fällen mit Alkohol zwei verschiedene Barytsalze abgeschieden. Das zuerst ausfallende Produkt enthielt noch Phosphor, das zweite war phosphorfrei, keines von beiden war kristallinisch. Das phosphorfreie Produkt ergab einen Baryumgehalt von 30,93 Proz. Haiser hält es für trioxyvaleriansaures Baryum, $Ba(C_5H_9O_5)_2$, welches 31,42 Proz. Baryum verlangen würde. Das phosphorhaltige Produkt hinterließ einen Glührückstand von 69,09 Proz. phosphorsaurem Baryt; Haiser möchte es für das Baryumsalz einer Trioxyvalerianphosphorsäure halten, welche allerdings 69,48 Proz. Baryumphosphat fordern würde.

Haiser versuchte noch eine andere Art Spaltung, Einwirkung von Zinn und Salzsäure, konnte jedoch auch hierdurch die Natur des dritten Spaltungsproduktes nicht feststellen. Der Spaltungsversuch ergab jedoch quantitativ dieselbe Ausbeute an Sarkin wie der erste. Die Ausbeuten entsprachen folgender von Haiser mit Vorbehalt aufgestellten Formel:

$$O{=}P\begin{cases}OH\\OH\\O{-}C_4H_7O{-}COOH\end{cases}\qquad C_5H_3N_4O \text{ (an } C_4H_7O\text{)}$$

Es ergibt sich aus der Arbeit von Haiser, daß die Inosinsäure sicher eine gepaarte Phosphorsäure ist, welche neben einer dritten Substanz noch Sarkin enthält. Die Analysenzahlen für Sarkin stimmen so gut mit den berechneten überein, daß dieser Punkt über jeden Zweifel erhaben ist. Anders verhält es sich mit der dritten Komponente, deren Natur er nicht aufgeklärt hat. Die Annahme, daß es sich um eine Trioxyvaleriansäure handelt, stützt sich im wesentlichen nur auf die Zusammensetzung des Inosinats im Vergleich zu den zwei isolierten Spaltungsprodukten und dem Barytgehalt des amorphen Salzes.

Auf eine ganz andere viel näher liegende Annahme weist aber schon eine Angabe von Haiser selbst hin. Er bemerkt nämlich, daß die beiden Substanzen, die er bei seinen Spaltungsversuchen außer Sarkin und Phosphorsäure bekam, beim Verbrennen Caramelgeruch verbreiten, bei trockener Destillation ein Produkt liefern, welches deutliche Furfurolreaktion gibt; außerdem reduzieren beide Substanzen Fehlingsche Lösung. Diese Angaben weisen mit allergrößter Wahrscheinlichkeit auf ein Kohlehydrat und zwar wegen der reichlichen Furfurolbildung auf eine Pentose hin. Da die Pentose und die Trioxyvaleriansäure die gleiche Bruttoformel besitzen ($C_5H_{10}O_5$), so stimmen die Analysendaten gleich gut zu beiden Annahmen. Es könnte dann die phosphorfreie Substanz ein Baryumpentosat ($C_5H_9O_5ba$) gewesen sein, welches 30,54 Proz. Baryum verlangt, während Haiser 30,93 Proz. fand. Die phosphorhaltige Substanz wäre aber als basisches Baryumpentosephosphat, $O:P(Oba)_2-O-C_5H_8baO_4$, anzusprechen, welches 69,49 Proz. Glührückstand an Baryumphosphat geben müßte, während Haiser 69,09 Proz. fand. Ich habe nun auf Vorschlag von Herrn Professor Hofmeister versucht, die Natur dieses dritten Bestandteiles der Inosinsäure aufzuklären.

Diese Aufgabe bot in doppelter Richtung Interesse. Als purinhaltige gepaarte Phosphorsäure kann die Inosinsäure als eine echte Nucleïnsäure aufgefaßt werden; zum mindesten ist die Analogie ihres Baues mit dem der echten Nucleïnsäuren eine so schlagende, daß von der Aufklärung ihrer Konstitution wichtige Rückschlüsse auf den Bau der sonst bekannten Nucleïnsäuren gezogen werden dürfen. Dazu kommt, daß sie durch die Kristallisierbarkeit und Konstanz der Zusammensetzung keinem Zweifel an ihrer chemischen Individualität Raum läßt. Der Umstand, daß Haisers Beobachtungen die Gegenwart einer Pentose in ihrem Molekül wahrscheinlich machen, konnte dieses Interesse nur verstärken, einmal weil hier die Möglichkeit gegeben schien, über die Bindungsweise des Pentosemoleküls in der Inosinsäure Genaueres zu erfahren, sodann weil jeder neuen Auffindung einer Pentose im Tierkörper ein klinisches Interesse zukommt.

Die Quelle der bei der Pentosurie meist gefundenen d-l-Arabinose[1]), ebenso auch der von Luzzatto[2]) beobachteten l-Arabinose ist nämlich gänzlich unbekannt; die bisher im Tierkörper sicher identifizierte Pentose, die Xylose des Pankreas, hat eine so ab-

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 33, 2243; 35, 1467.
[2]) Diese Beiträge 6, 87.

weichende Konstitution, daß sie nicht als Muttersubstanz der Harnpentose aufgefaßt werden kann.

Andererseits muß, wie Neuberg betont, die Quelle der Harnpentose im Organismus selbst liegen, da mit der Nahrung keine inaktive Arabinose aufgenommen wird. Es war daher immerhin daran zu denken, daß das am meisten verbreitete und mit einem lebhaften Stoffwechsel begabte Gewebe des Tierkörpers, der Muskel, trotz des an sich geringen Pentosengehalts befähigt sein könnte, die bei der Pentosurie täglich ausgeschiedenen Mengen zu liefern.

Darstellung des Baryuminosinats.

Liebigs Darstellungsmethode hat in den Händen der Nachfolger so oft zu Mißerfolgen geführt, daß ich es vorzog, mich zuerst mehr an Haisers Vorschrift zu halten. Wie er, benutzte ich als Ausgangsmaterial das Fleischextrakt der „Liebigs Fleisch-Extract-Compagnie", die mich dabei durch Überlassung von Extrakt in dankenswertester Weise unterstützt hat. Da das Ausziehen mit Alkohol und die Verwendung von Silbersalz das Verfahren Haisers, sobald man mit größeren Mengen arbeitet, kostspielig und unhandlich machen, so habe ich eine neue Methode der Darstellung ausgearbeitet, welche erheblich einfacher und billiger ist als das Haisersche Verfahren.

Ich gebe im folgenden eine Vorschrift, welche, vorausgesetzt daß das Fleischextrakt genügend Inosinsäure enthält, was nach Haiser nicht immer der Fall zu sein scheint, bei genauer Ausführung sicher zum Ziele führt:

500 g Liebigsches Extrakt werden in $2^1/_2$ Litern Wasser gelöst. Die Lösung wird mit etwa 40 g reiner Tierkohle verrührt und dann in einen Wärmeschrank (bei 37°) gestellt, wo sie unter oftmaligem Durchrühren 24 Stunden verbleibt. Es wird dann die Flüssigkeit eine halbe Stunde mit der Schüttelmaschine kräftig geschüttelt, hernach sofort filtriert. Das Filtrieren nimmt lange Zeit in Anspruch; es wird dadurch die Lösung von allerhand Verunreinigungen befreit, vor allem von geringen Mengen einer kolloidalen Substanz, welche sonst das weitere Arbeiten außerordentlich erschwert. Das Filtrat, eine dunkelrote bis braune Lösung, die ganz klar sein soll, wird mit Wasser auf 5 Liter verdünnt.

Aus dieser Flüssigkeit werden die anorganischen Phosphate durch Fällung mit einer 20proz. Lösung von Baryumacetat beseitigt, doch soll ein Überschuß an Acetat vermieden werden. Dann wird von einer kaltgesättigten Lösung von Baryumhydroxyd so lange zugesetzt, bis die vorher saure Reaktion schwach alkalisch zu werden beginnt. Es wird dann filtriert, und das Filtrat noch genau auf die Anwesenheit von Phosphorsäure geprüft, doch darf bei den Phosphorproben mit konzentrierter Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon nicht zu stark erhitzt werden, da sonst organisch gebundener Phos-

phor frei wird. Wird noch anorganischer Phosphor nachgewiesen, so muß derselbe durch nochmaligen Zusatz von Baryumacetat und Baryumhydroxyd beseitigt werden.

Die von Phosphat befreite Lösung gibt nach Kochen mit konzentrierter Salpetersäure mit molybdänsaurem Ammon durch Abspaltung des organisch gebundenen Phosphors neuerlich eine starke Phosphorsäurereaktion.

Es wird nun eine Lösung von basischem Bleiacetat so lange zugesetzt, bis keine weitere Fällung mehr entsteht, der Niederschlag von der Flüssigkeit durch Filtrieren oder noch besser durch Zentrifugieren getrennt, schließlich noch auf dem Saugfilter abgesaugt. Der Niederschlag wurde einer dreimaligen Waschprozedur unterzogen, deren genaue Ausführung sich als sehr wichtig für die Erzielung einer guten Ausbeute erwies. Ich rührte den Niederschlag in der Reibschale mit etwa $1^1/_2$ Litern destillierten Wassers an, so daß eine möglichst gleichmäßige Aufschwemmung entstand, und saugte dann mit der Nutsche die Flüssigkeit ab; beim dritten Waschen gelang es nur dadurch, den Niederschlag von der Flüssigkeit zu trennen und ein gründliches Auswaschen zu ermöglichen, daß auf das Nutschfilter eine Schicht fein gepulverten Baryumcarbonats gestreut wurde.

Der so mit Baryumcarbonat vermengte Niederschlag wird wieder verrieben, aufgeschwemmt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffs in der Kälte wiederum mit basischem Bleiacetat bis zur vollständigen Ausfällung versetzt. Der Niederschlag wird, wie oben beschrieben, dreimal durch Aufschwemmen ausgewaschen, wieder mit Schwelwasserstoff zerlegt, wobei man ein schwach gelb gefärbtes Filtrat erhält. Dieses wird nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffs bei niederer Temperatur (etwa 40°) langsam eingedampft. Ich benutzte dazu sehr große etwa 4 bis 5 Liter fassende Schalen mit flachem Boden, die ich einfach in einen großen Brutraum stellte, dessen Temperatur sich bei etwa 40° hielt. Dabei traten am Boden allmählich Kriställchen auf, welche zum Teil kugelige Drusen bildeten. Wenn der Schaleninhalt bis auf etwa 30 ccm abgedampft ist, wird die ganze Masse in ein Spitzglas gebracht, nach Absetzen der Kristalle der überstehende Sirup abgegossen und die zarte Kristallmasse durch mehrmaliges Aufschwemmen mit ganz wenig Wasser von den Resten des Sirups annähernd vollständig befreit; sie stellt dann eine lachsrote Masse dar, die durch Umkristallisieren aus heißem Wasser von der rot gefärbten Substanz befreit wird und dann millimeterlange schöne Nädelchen bildet, welche durch nochmaliges Umkristallisieren schneeweiß erhalten werden.

0,1115 g lufttrockenes Barytsalz ($7^1/_2 H_2O$) verloren bei 100°, zur Gewichtskonstanz erhitzt, 0,0210, also 18,83 Proz. Wasser.

0,1683 g Barytsalz verloren 0,0317, also 18,89 Proz. Wasser.

Wasserverlust gefunden im Mittel 18,86 Proz.; für $C_{10}H_{12}N_4PBaO_9 + 6^1/_2 H_2O$ berechnen sich 18,93 Proz. Wasser.

0,1377 g bei 100° getrockneten Barytsalzes gaben bei 20,4° und 754,9 mm Quecksilberdruck 13,93 ccm Stickstoff, also 11,50 Proz.; berechnet sind 11,19 Proz.

Meine Ausbeuten erreichten nicht ganz die von Haiser angegebenen Zahlen; doch scheint auch er öfters nicht die angegebene

Menge von 4 bis 7 g aus 1 kg Extrakt erhalten zu haben und führt dies auf die Qualität des Extrakts zurück. Meine beste Ausbeute betrug einmal etwa 4 g ganz reinen Barytsalzes aus 1 kg Extrakt; in der Regel kann man bei sorgfältigem Arbeiten darauf rechnen, 3 g Barytsalz aus 1 kg Extrakt zu erhalten.

Die Substanz zeigte genau das Verhalten des Baryuminosinats. Sie gab die Phosphorsäurereaktion mit Salpetersäure und molybdänsaurem Ammon erst nach Zerkochen mit Salpetersäure. Ebenso entstand der für Purinbasen typische weiße Niederschlag in ammoniakalischer Lösung mit Silbernitratlösung erst nach Aufspaltung des Salzes.

Auch bei langem Kochen mit Fehlingscher Lösung konnte ich keine Reduktion erzielen. Dagegen bekam ich sehr intensive Farbenreaktion mit α-Naphtol und konzentrierter Schwefelsäure (Molischsche Reaktion) und außerdem sehr typische Pentosenreaktionen mit Salzsäure und Orcin oder Phloroglucin.

Hydrolyse der Inosinsäure.

Meine nächste Aufgabe war einerseits die Feststellung der Natur der vorliegenden Pentose, andererseits die quantitative Bestimmung der hydrolytischen Produkte.

Eine 1 proz. Lösung des Baryumsalzes in Wasser wurde mit der berechneten Menge Schwefelsäure versetzt, um die Inosinsäure frei zu machen, und dann die Lösung im Kolben aus Jenaer Glas am Rückflußkühler so lange gekocht, bis eine Probe der Flüssigkeit, mit Barytwasser von dem abgespaltenen Phosphat vollständig befreit, keine gepaarte Phosphorsäure mehr enthielt. Es war dazu etwa 24 stündiges Sieden notwendig, und die Flüssigkeit färbte sich schwach gelb. Es wurde dann aus der mit verdünnter Schwefelsäure versetzten Lösung mit einer 20 proz. Lösung von Phosphorwolframsäure das Sarkin vollständig ausgefällt und das Sarkinphosphorwolframat und Baryumsulfat abfiltriert, dann aus der Flüssigkeit die überschüssige Schwefelsäure, Phosphorwolframsäure und die abgespaltene Phosphorsäure durch Barytwasser ausgefällt, der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und einmaliges Aufkochen beseitigt. Die dann erhaltene Flüssigkeit war ganz klar und nur schwach gelb gefärbt; sie gab keine Phosphorsäure- und Purinbasenreaktion, enthielt aber noch Spuren von Baryt; außerdem gab die Lösung starke Molischsche und Pentosenreaktion (mit Orcin-Salzsäure) und reduzierte Fehlingsche Lösung.

Die Lösung wurde bei etwa 40° im Wärmeschrank auf etwa 50 ccm eingeengt, wobei noch etwas Baryumcarbonat zur Abscheidung kam. Die eingeengte Lösung wurde in einem Halbschattenapparat mit dreiteiligem Gesichtsfeld auf ihre optische Aktivität untersucht und vollständig inaktiv gefunden[1]). Die Flüssigkeit gab mit salzsaurem Phenylhydrazin und Natriumacetat in wässeriger Lösung ein klumpig ausfallendes, schön gelb gefärbtes Osazon, welches nach zweimaligem Umkristallisieren bei raschem Erhitzen scharf bei 158 bis 159° schmolz. Zur Bestimmung der optischen Wirksamkeit des Osazons hielt ich mich an die Neubergsche Pyridin-Alkoholmethode. Es wurden 0,05 g Phenylosazon in einem Gemisch von 6 ccm absoluten Alkohols und 4 ccm reinen Pyridins gelöst. Die Lösung erwies sich in dem Halbschattenpolarimeter, das bei einiger Übung noch 0,02° Drehung zu ermitteln gestattet, als inaktiv.

Es ist also ganz zweifellos eine Pentose im Molekül der Inosinsäure enthalten, und zwar wird sie anscheinend unter bestimmten Verhältnissen optisch inaktiv erhalten. Von inaktiven Pentosen kämen für den Tierkörper zunächst nur die d-l-Xylose und d-l-Arabinose in Betracht. Im vorliegenden Falle wird die Vermutung, daß es sich um eine inaktive Arabinose handelt, gestützt durch das Verhalten des Schmelzpunktes. A. Wohl[2]) gibt dafür zwar 163° an; Emil Fischer[3]) fand ihn nach sehr oftmaligem Umkristallisieren zu 166 bis 167°, dagegen für das der inaktiven Xylose zu 210 bis 215°; ich fand 158 bis 159°, wobei zu bedenken ist, daß ich wegen Mangel an Substanz nur zweimal umkristallisieren konnte; bemerkenswerterweise wird für die d-l-Arabinose des Harns ebenfalls der Schmelzpunkt zu 158 bis 160° angegeben. Da von inaktiven Pentosen im Tierkörper bisher nur diese bekannt ist, liegt die Annahme, daß die aus Inosinsäure abgespaltene Pentose mit jener der gewöhnlichen Pentosurie, also mit d-l-Arabinose identisch ist, überaus nahe. Ich verkenne aber nicht, daß zur Sicherung dieser Annahme weitere Beweise notwendig sind.

Um zu zeigen, daß außer Phosphorsäure, Sarkin und Pentose in dem Molekül der Inosinsäure kein weiterer Bestandteil enthalten ist, habe ich einen Versuch gemacht, die Pentose quantitativ direkt aus dem inosinsauren Baryum zu bestimmen und habe zu diesem

[1]) In einem anderen, hier nicht näher beschriebenen Spaltungsversuch zeigte die Lösung deutliche Linksdrehung.

[2]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **26**, 742.

[3]) Ebenda **27**, 2486.

Zweck die Methode von Grund[1]) benutzt, nach welcher durch Destillation der pentosehaltigen Substanz aus verdünnter Salzsäure die ganze Menge an Pentosen als Furfurol abdestilliert wird, um dann nach Zusatz einer Lösung von Phloroglucin in Salzsäure als Furfurolphloroglucid bestimmt zu werden.

Ich zersetzte zunächst eine abgewogene Menge Baryuminosinat, wie oben beschrieben, durch Hydrolyse, fällte aus der Lösung das Sarkin mit Phosphorwolframsäure unter Zusatz von Schwefelsäure vollständig aus, filtrierte und wusch mit Wasser nach, um die Flüssigkeit möglichst quantitativ zu erhalten. Mit diesem Filtrat machte ich dann die Pentosenbestimmung:

0,5020 Baryuminosinat (lufttrocken) gaben 0,1024 Furfurolphloroglucid. also 20,39 Proz.; nach der von Grund für die Berechnung der Arabinose angegebenen Formel (Phloroglucid $\times$ 1,148 $+$ 0,0025 $=$ Arabinose) erhält man für 0,1024 Phloroglucid 0,1200 Arabinose, während 0,5020 Baryuminosinat 0,1217 Pentose enthalten müßte, falls kein anderer Körper mehr im Molekül der Inosinsäure vorhanden ist.

Zur Sicherung der Angaben Haisers, betreffend seine quantitativen Ausbeuten an Sarkin, habe ich noch zwei Bestimmungen des Sarkins als Phosphorwolframat vorgenommen.

Es wurde eine abgewogene Menge Baryuminosinats durch Destillation mit verdünnter Salzsäure gespalten und von der Pentose vollständig befreit; aus der salzsauren Lösung wurde mit Phosphorwolframsäure das Sarkin ausgefällt, abfiltriert und gewaschen, sodann der Niederschlag in Natronlauge aufgelöst und in dieser Lösung der Stickstoff bestimmt:

Der Phosphorwolframsäureniederschlag aus 0,0925 luftrockenem Baryuminosinat gab 9,589 Proz. N.

In einem zweiten Versuch lieferte der Phosphorwolframsäureniederschlag aus 0,5108 Inosinat 10,072 Proz. N; danach lieferte das Baryuminosinat 23,76 Proz. Sarkin, während die Rechnung 22,00 Proz. verlangt.

Haiser gibt an, daß die Ausbeute an Sarkin der Gleichung:

$$C_{10}H_{13}N_4PO_8 + H_2O = C_5H_4N_4O + (OH)_2OP.C_4H_8O_4.COOH$$

entspricht, ohne jedoch Zahlen anzuführen. Meine Zahlen stimmen mit dieser Angabe innerhalb der bei Spaltungsversuchen gegebenen Fehlergrenzen überein.

Nach diesen Bestimmungen enthält die Inosinsäure auf je einen Phosphor je ein Sarkin und eine Pentose unter Ausschluß jedes weiteren Bestandteils:

$$C_{10}H_{13}N_4PO_8 + 2\,H_2O = C_5H_4N_4O + C_5H_{10}O_5 + H_3PO_4.$$

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 111.

Was nun die Konstitution der Säure betrifft, so darf man auf Grund von Haisers Versuchen mit Bestimmtheit annehmen, daß die Pentose direkt mit der Phosphorsäure verbunden ist, und daß er bei der Hydrolyse ein vom Sarkin befreites basisches Baryumsalz einer Pentose-Phosphorsäure in Händen gehabt hat, womit der Barytgehalt sehr annähernd übereinstimmt. Das Sarkin wird bei einfacher Hydrolyse anscheinend rascher und vollständiger abgespalten als die Pentose. Der Umstand, daß die Inosinsäure an sich nicht reduziert, weist darauf hin, daß die Aldehydgruppe darin nicht vorgebildet ist; vermutlich ist somit an deren Stelle das Sarkin angelagert. Man könnte also folgende Konstitutionsformel aufstellen:

$$(HO)_2.PO.O.CH_2(CHOH)_3.CH:(C_5H_3N_4O),$$

wobei nur noch der Ort der Verknüpfung von Pentose mit Phosphorsäure einerseits, mit Sarkin andererseits genauer zu bestimmen bliebe.

Die freie Pentose des Fleischextrakts.

Nach Ausfällung der Inosinsäure mit basischem Bleiacetat gibt das Filtrat noch Pentosenreaktion. Es lag die Vermutung nahe, daß hier die gleiche Pentose wie in der Inosinsäure, nur abgespalten, vorlag. Zu ihrer Darstellung und Identifizierung verfuhr ich in der Art, daß ich die Filtrate der Bleifällung zunächst mit ammoniakalischem Bleiacetat fällte, den Niederschlag nach der für das inosinsaure Blei genau beschriebenen Methode sehr gründlich auswusch, mit Schwefelwasserstoff zerlegte, und das Filtrat nach Beseitigung des Schwefelwasserstoffs von neuem mit ammoniakalischem Blei bis zu vollständiger Fällung versetzte; der Niederschlag wurde wieder gut ausgewaschen und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. So wurde eine klare, gelbgefärbte Lösung erhalten, welche keinen Phosphor mehr enthielt, wohl aber starke Pentosenreaktion mit Orcin-Salzsäure gab. Die Flüssigkeit wurde bis auf ein kleines Volumen abgedampft und dann mit der sechsfachen Menge 95 proz. Alkohols versetzt, wobei ein Teil in Lösung ging. Der ungelöste Teil wurde wieder in wenig Wasser gelöst, von neuem mit Alkohol behandelt und dies Vorgehen so oft wiederholt, bis der in Alkohol unlösliche Niederschlag keine Pentosenreaktion mehr gab. Schließlich gelang es nicht mehr, auf diesem Wege einen pentosenfreien Niederschlag zu erhalten. Es wurde dann die eingedampfte wässerige Lösung nochmals mit Alkohol gefällt, wobei neben einem

noch pentosehaltigen Sirup eine gelbgefärbte klare alkoholische Lösung erhalten wurde, die nach Entfernung des Alkohols stark reduzierte, mit Phenylhydrazin ein Osazon von dem makroskopischen und mikroskopischen Aussehen des oben beschriebenen gab und trotz hoher Konzentration optisch inaktiv war.

Das Fleischextrakt enthält danach neben der aus der Inosinsäure abspaltbaren Pentose noch einen im freien Zustande befindlichen Anteil. Es ist wohl die Vermutung gerechtfertigt, daß diese freie Pentose[1]) ganz oder zum Teil aus der Inosinsäure oder einer analogen Verbindung bei der Darstellung des Extrakts abgespalten wird. Da sich nach möglichst vollständiger Abscheidung der Inosinsäure und Entfernung der Phosphate stets noch eine erhebliche Quantität organischen Phosphors nachweisen läßt, wird in erster Reihe daran zu denken sein, daß die Darstellung des Fleischextrakts oder die vorausgehende Autolyse des Fleisches mit einer nicht unerheblichen Spaltung der Inosinsäure verknüpft ist. Es ist bekannt, daß der absterbende Muskel eine Erhöhung seines Gehalts an Phosphorsäure zeigt und daß diese schon durch mechanische Zerkleinerung und Temperaturerhöhung befördert wird[2]). Es ist zurzeit nicht zu beurteilen, einen wie großen Anteil an diesen Vorgängen die Inosinsäure hat, ja es dürfte die Vermutung gestattet sein, daß die Inosinsäure selbst schon ein Bruchstück eines im Muskel vorgebildeten, aber sehr labilen großen Nucleïnmoleküls darstellt. Darüber sowie über die physiologische Bedeutung dieser Verhältnisse könnten nur weitere Untersuchungen entscheiden. Ebenso muß die Frage, ob etwa der Muskel als Ursprungsort der bei der Pentosurie gefundenen Arabinose anzusehen ist, einer weiteren Prüfung unterzogen werden. Die Möglichkeit einer solchen Annahme ist nicht von der Hand zu weisen, denn wenn auch der Gehalt des menschlichen Muskels an Pentose auf Grund der Untersuchung von Bendix[3]) nur niedrig veranschlagt werden kann (0,053 Proz., also etwa zehnmal geringer als im Rindspankreas), so ist auf der anderen Seite bei der mächtigen Entwickelung des Muskelsystems immerhin damit zu rechnen, daß die bei Pentosurie im Harn täglich ausgeschiedenen Mengen, die Neuberg bis zu 30 bis 36 g veranschlagt, ihr Auftreten einer Störung in dem intermediären Stoffwechsel des Muskels verdanken können.

---

[1]) Die Untersuchung dieser Pentose ist noch nicht abgeschlossen.

[2]) F. Urano, Diese Beiträge 10, 112.

[3]) Die Pentosurie, S. 20. Enke in Stuttgart.

Nachtrag bei der Korrektur.

Das am 18. August ausgegebene Heft der „Biochemischen Zeitschrift“ bringt eine Untersuchung von C. Neuberg und B. Brahn über die Inosinsäure, die in ähnlicher Weise wie die vorstehende Arbeit den Nachweis erbringt, daß die Inosinsäure eine Nucleïnsäure ist, die bei der Aufspaltung quantitativ in Phosphorsäure, Hypoxanthin und Pentose zerfällt. Während ich mich aber nicht von der optischen Aktivität der abgespaltenen Pentose überzeugen konnte, gelang es Neuberg und Brahn, ein linksdrehendes Pentosazon zu erhalten. Sie sprechen danach die Pentose der Inosinsäure als l-Xylose an. Auffällig bleibt dabei, daß die bei Hydrolyse der Inosinsäure erhaltenen Lösungen, wie diese Autoren und ich übereinstimmend finden, niemals Rechtsdrehung zeigten, was doch bei Auftreten von freier l-Xylose zu erwarten war. Neuberg und Brahn erklären dieses Verhalten durch unvollständige Zerlegung der linksdrehenden Inosinsäure einerseits, durch partielle Zerstörung der rechtsdrehenden Pentose andererseits. Doch war in meinen Versuchen die Inaktivität auch nach Verschwinden der organisch gebundenen Phosphorsäure, also nach totaler Zerlegung der Inosinsäure, vorhanden, obgleich die Lösung reichlich Pentose enthielt. Dieser Punkt bedarf somit noch der Aufklärung.

XXIII.

Über tierische Peroxydasen.

Von Dr. **Ernst von Czyhlarz,**
Privatdozenten für innere Medizin,

und Dr. **Otto von Fürth,**
a. ö. Professor für medizinische Chemie an der Wiener Universität.

1.

Dank einer Reihe von Untersuchungen auf pflanzenphysiologischem Gebiete hat die Lehre von den oxydativen Fermenten im Verlaufe der letzten Jahre eine wesentliche Ausgestaltung erfahren, und ist es als ein namhafter Fortschritt zu bezeichnen, daß man, insbesondere aus den Arbeiten von Bach und Chodat, gelernt hat, zwischen den direkten Oxydasen und den Peroxydasen (indirekten Oxydasen), welche nur bei Gegenwart des Hydroperoxyds oder eines anderen Peroxyds oxydierend zu wirken vermögen, scharf zu unterscheiden [1]).

Die durch diese Erkenntnis herbeigeführte Klärung der Begriffe ist jedoch bisher in erster Linie der Pflanzenphysiologie zugute gekommen. Auf dem Gebiete der Tierchemie dagegen ist, wie eine Durchsicht der Literatur lehrt, eine Sichtung des in bezug auf oxydative Fermente angehäuften Tatsachenmaterials von den neuen Gesichtspunkten aus kaum ernstlich in Angriff genommen worden. Einen Teil dieser Lücke auszufüllen, war Zweck der vorliegenden Untersuchung, welche sich jedoch auf jene oxydativen Fermente beschränkt, die man kurz mit dem Schlagworte „guajakbläuende Oxydasen“ zu charakterisieren pflegt.

Die wichtigsten auf diesem Gebiete vorliegenden Erfahrungen lassen sich etwa folgendermaßen gruppieren.

---

[1]) Vgl. das Sammelreferat von A. Bach und R. Chodat, Über den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten. Biochem. Zentralbl. 1, 416 (1903).

1. Oxydasen des Blutes. Seit Schönbeins klassischen Fermentarbeiten war die Guajakreaktion des Blutes (d. i. die Blaufärbung des Guajakharz-Terpentinölgemenges bei Gegenwart von Blut) Gegenstand zahlreicher Arbeiten [vgl. E. Schaer [1])]. In jüngster Zeit wurde empfohlen, das Terpentinöl, welches seine Wirkung anscheinend nur seinem Gehalt an Peroxyden verdankt, durch Wasserstoffsuperoxyd [Carlson [2])], das Guajakharz durch das wirksame Prinzip desselben, die Guajakonsäure, zu ersetzen [vgl. Kobert [3])]; doch werden die Vorzüge des Hydroperoxyds dem Terpentinöl gegenüber von Schumm [4]) neuerdings wieder in Frage gezogen. O. und R. Adler [5]) haben gezeigt, daß eine große Anzahl von der aromatischen Reihe angehörigen Chromogenen mit Erfolg an Stelle der Guajakonsäure bei der Blutreaktion benutzt werden können. Während G. Bertrand [6]) diese Reaktion einer in den roten Blutkörperchen enthaltenen Peroxydase zuschrieb, hat Moitessier [7]) gezeigt, daß die Wirkung durch Kochen nicht aufgehoben wird und auch noch der Hämatinkomponente des Hämoglobins (nicht aber dem Hämatoporphyrin) zukommt. Nach Liebermann [8]) verwandelt ein in altem Terpentinöl enthaltener, saurer, in Wasser löslicher Körper von stark oxydierenden Eigenschaften das Hämoglobin in Methämoglobin, und erst dieses soll mit Guajak reagieren, während Pighini [9]) wiederum die Theorie aufstellt, die Guajakreaktion sei gar nicht dem Hämoglobin als solchem eigentümlich, sondern einer in jeder Lösung desselben vorhandenen, von einer hydrolytischen Spaltung desselben herrührenden Beimengung kolloidalen Eisenhydroxyds (die Oxydasenwirkung von Metallsolen ist von Liebermann genauer studiert worden), welche vielleicht von einer hydrolytischen Spaltung des Hämoglobins herrühre.

2. Oxydasen der Eiterzellen. Die Guajakreaktion des Eiters wurde bereits im Jahre 1868 von Klebs beschrieben, später von Achalme bestätigt. Vitali [10]) und E. Meyer [11]) betonen, daß die Guajaktinktur bereits

---

[1]) E. Schaer, Neuere Beobachtungen über Blutnachweis mittels der Guajakprobe. Arch. d. Pharm. 1898, S. 571.

[2]) C. E. Carlson, Die Guajakblutprobe und die Ursachen der Blaufärbung der Guajaktinktur. Zeitschr. f. physiol. Chem. 48, 69 (1906).

[3]) R. Kobert, Über einige Enzyme wirbelloser Tiere. Pflügers Arch. 99, 131 (1903).

[4]) O. Schumm, Zur Kenntnis der Guajakblutprobe und einige ähnliche Reaktionen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 374 (1906).

[5]) O. und R. Adler, Über das Verhalten gewisser organischer Verbindungen gegenüber Blut. Ebenda 41, 58 (1904).

[6]) G. Bertrand, Bemerkung in einem Referate zu vorstehender Arbeit. Bull. Inst. Pasteur 1904, S. 398.

[7]) J. Moitessier, Sur le rôle de la Peroxydase dans les réactions colorées, obtenues avec le sang. Compt. rend. Soc. de Biol. 56, II, 373 (1904).

[8]) L. Liebermann, Beiträge zur Kenntnis der Fermentwirkungen. Pflügers Arch. 104, 119 ff.; vgl. auch 108, 489 u. 498.

[9]) G. Pighini, Sulla reazione del guajaco data del sangue. Arch. de fisiol. 4, 57.

[10]) Vitali, Über ein oxydierendes Ferment im Eiter. R. Accad. delle scienze di Bologna 1901. Vgl. Jahresber. Tierchem. 31, 877.

[11]) E. Meyer, Über die cytodiagnostische Bedeutung der Guajakreaktion. Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 1578; vgl. ebenda 1903, Nr. 35.

ohne Wasserstoffsuperoxydzusatz mit Eiter reagieren könne, und letzterer gründet eine chemische Unterscheidung zwischen polynucleären Leukocyten (Granulocyten) und Lymphocyten auf diese Beobachtung, während Linossier[1]) die Ansicht ausspricht, daß Guajakharz und ähnliche Chromogene nur dann direkt ohne Wasserstoffsuperoxyd mit Eiter eine Farbenreaktion geben, wenn sich im Reagens bei längerem Stehen Peroxyde gebildet hätten.

Jüngst hat F. Winkler die oxydative Synthese von Indophenol aus α-Naphtol und Phenylendiamin zur mikrochemischen Leukocytenfärbung verwertet.

3. Oxydasen der physiologischen Sekrete. Guajakoxydasen sind in den meisten Sekreten nachgewiesen worden. So im Speichel [Slowzoff[2]), Carnot[3])], im Magensaft und in der Galle [Schumm[4])], im Nasensekret (Carnot), im Sperma [Poehl[5]), Carnot], in dem die Froscheier umgebenden Schleime [Herlitzka[6])], im Urin [Schumm, Carrière[7])] und in der Milch [Arnold[8]), Raudnitz[9]), Gilles[10]) und zahlreiche andere]. Auch hier wiederum wurde die Guajakreaktion teils mit, teils ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd ausgeführt und entweder auf die Flüssigkeit als solche oder auf die darin enthaltenen geformten Bestandteile zurückgeführt.

4. Oxydasen der Organe. Am schwierigsten sind die über die Organoxydasen vorliegenden Angaben zu deuten.

Während nach Gessard[11]) Guajakharz bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd durch die meisten organischen Flüssigkeiten gebläut werden soll, betrachtet de Rey-Pailhade[12]) das Fehlen der Guajakreaktion als ein Unterscheidungsmerkmal der tierischen Gewebe pflanzlichen gegenüber.

Nach Abelous und Biarnès[13]) geben nur ausgeblutete, nicht aber bluthaltige Organe von Säugetieren die Guajakreaktion. Beim Hunde fand sich in Milz und Lunge viel, in Leber und Pankreas gar keine Oxydase, in Muskeln und Ovarium wenig davon.

---

[1]) Linossier, Contribution à l'etude des ferments oxydants. Sur la Peroxydase du pus; Compt. rend. Soc. de Biol. 50, 373.

[2]) Slowzoff, Zur Lehre von den Oxydasen des Tierkörpers. Inaug.-Diss. Petersburg 1899 (russisch), zit. nach Jahresber. f. Tierchem. 1899, S. 905.

[3]) Carnot, Sur un ferment oxydant de la salive et de quelques autres sécrétions. Compt. rend. Soc. de Biol. 48, 552 (1896).

[4]) Loc. cit.

[5]) A. Poehl, Action physiologique de la spermine etc. Compt. rend. 115, 129 (1892).

[6]) A. Herlitzka, Sull' ontogenesi dei fermenti. Biologica 1, 7 (1907).

[7]) G. Carrière. Compt. rend. Soc. de Biol. 51, 569 (1899).

[8]) C. Arnold, Einige neue Reaktionen der Milch. Arch. f. Pharm. 19, 41 (1881).

[9]) R. W. Raudnitz, Über sogenannte Fermentreaktionen der Milch. Zentralbl. f. Physiol. 12, 790 (1898).

[10]) C. Gilles, Le ferment oxydant du lait. Journ. de Physiol. 4, 438 (1902).

[11]) C. Gessard, Compt. rend. Soc. de Biol. 55, 637 (1903).

[12]) J. de Rey-Pailhade, Ebenda 48, 479 (1896).

[13]) J. E. Abelous und G. Biarnès, Sur l'existence chez les Mammifères d'une Oxydase-Globuline, ses charactères et ses proprietés. Arch. de Physiol. 30, 664; vgl. auch Compt. rend. Soc. de Biol. 49, 285, 493, 576.

Lépinois[1]) beschrieb eine in der Schilddrüse vorkommende, nur bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd wirksame, bei Kochhitze nicht zerstörbare „Oxydase“. Nach Slowzoff[2]) findet sich bei Hunden nur in den Milch- und Speicheldrüsen reichlich Oxydase, während die Reaktion mit anderen Organen, vorausgesetzt, daß das Blut sorgfältig entfernt worden ist, negativ ausfällt. Dagegen vermochte N. Sieber[3]) wiederum aus Milz und Parotis durch Neutralsalzlösungen oxydative Fermente zu extrahieren.

Rosell[4]) prüfte verschiedene Organe mit der Guajak- und Indophenolreaktion und erhielt mit letzterer in Pankreas, Speicheldrüse, Milz, Knochenmark und Thymus positive Resultate.

Hugounenq und Paviot[5]) fanden bei Untersuchung verschiedener Tumoren namentlich solche, welche durch schnelles Wachstum ausgezeichnet waren, oxydasenreich, während E. Meyer[6]) besonders solche mit leukocytärer Infiltration bevorzugt fand.

Eine weitere Reihe von Beobachtungen bezieht sich auf wirbellose Tiere. Während Kobert[7]) trotz Anwendung der Kombination einer Lösung von reiner Guajakonsäure mit Wasserstoffsuperoxyd die Oxydase in der Körperflüssigkeit von Kephalopoden, gewissen Würmern und Ameisen vermißte, finden Abelous und Biarnès[8]) direkte (also ohne Zutun des Hydroperoxyds wirksame) Oxydasen in der Hämolymphe des Krebses, Giard[9]) ebensolche in den Geweben gewisser Tunicaten, Piéri[10]) und Portier[11]) bei den Vertretern der verschiedensten Tierkreise, wobei der letztgenannte hervorhebt, es handele sich in allen Fällen um leukocytenreiche Gewebe; auch sei die Reaktion an den Zerfall von weißen Blutzellen geknüpft, derart, daß sie im lebenden Gewebe überhaupt nicht und am besten erst einige Zeit nach dem Tode gelinge.

Eine besondere Erwähnung verdient schließlich eine aus jüngster Zeit stammende Arbeit von Lesser[12]). Dieser fand, daß die entbluteten Organe von Fröschen und Säugetieren die Guajakreaktion geben, wenn man erst das

---

[1]) Lépinois, Note sur les ferments oxydants indirectes de la glande thyroïde. Compt. rend. Soc. de Biol. **50**, 1177 (1898).

[2]) l. c.

[3]) N. Sieber, Über die oxydierenden Fermente. Gazeta lekarska **23**, 27 (polnisch), zitiert nach Jahresber. f. Tierchem. **32**, 944.

[4]) M. Rosell, Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inaug-Diss. Straßburg 1901.

[5]) L. Hugounenq et Paviot, Sur les propriétés oxydantes et peut-être dues à des actions diastatiques de quelques tumeurs malignes. Compt. rend. Soc. de Biol. **48**, 352 (1896).

[6]) l. c.

[7]) l. c.

[8]) l. c.

[9]) A. Giard, Sur l'existence chez certains animaux d'un ferment bleuissaut la teinture alcoolique de Gajac. Compt. rend. Soc. de Biol. **48**, 483 (1896).

[10]) Piéri et Portier, Présence d'une oxydase dans certains tissus des mollusques acéphales. Arch. de Physiol. **29**, 60 (1897).

[11]) Portier, Les oxydases dans la série animale. Thèse de Paris 1898 (G. Steinheil); zitiert nach Zentralbl. f. Physiol. **12**, 356.

[12]) Lesser, Zur Kenntnis der Katalase. Zeitschr. f. Biol. **48**, 1.

Reagens und dann das Wasserstoffsuperoxyd zusetzt, nicht aber, wenn man die umgekehrte Reihenfolge einhält. Er beobachtete ferner eine Hemmung der Reaktion durch die Gegenwart von leicht oxydablen Stoffen (wie z. B. Traubenzucker) und gewissen Organextrakten; er bezweifelt infolgedessen die Verschiedenheit von Oxydasen und Katalasen (Wasserstoffsuperoxyd zersetzenden Fermenten) und glaubt, man könne das Ausbleiben der Guajakreaktion in Katalaselösungen durch die Gegenwart von leicht oxydablen Stoffen, welche den aktiven Sauerstoff aufnehmen, erklären. Eine gleichfalls erst vor kurzem veröffentlichte Arbeit von W. Ewald[1]) über Beeinflussung der Reduktionsgeschwindigkeit des Oxyhämoglobins durch Katalase konnte ebenfalls den Gedanken an eine Oxydasennatur dieser letzteren nahe legen.

Ebenso wie über die Verbreitung und Abgrenzung, so gehen auch über die Eigenschaften der tierischen Oxydasen die Ansichten der verschiedenen Autoren sehr weit auseinander. Manche derselben wollen die oxydativen Fermente als Globuline betrachtet wissen, welche in reinem Wasser schwer löslich, durch Neutralsalze extrahierbar, durch Kohlensäure und Dialyse fällbar sein sollen (Abelous, Slowzoff, Sieber). Allerdings ist die wiederholt beobachtete Widerstandsfähigkeit dieser Oxydasen gegenüber verdauenden Enzymen mit einer Globulinnatur derselben schwer vereinbar und ist selbst über die wichtige Frage der Thermostabilität keine Einigung erzielt worden, indem manche Angaben dahin lauten, daß diese Oxydasen (nach Art anderer Fermente) bereits unter 70° zerstört werden, während andererseits die entgegengesetzte Angabe [Linossier[2]), Carnot[3]) u. a.], derzufolge die Guajakoxydasen selbst Siedehitze überdauern können, sogar die Fermentnatur derselben fraglich erscheinen läßt.

So sehen wir uns denn einer Fülle von Widersprüchen gegenüber, die einer Klärung dringend bedürfen.

Ein eingehendes Studium hat uns nun gelehrt, daß die auf diesem Gebiete herrschende Verwirrung durch die ungenügende Beachtung einer Reihe von wichtigen Faktoren erklärlich wird. Es sind dies namentlich folgende:

a) Die grundsätzliche Verschiedenheit der fermentähnlichen Wirkung des reinen Blutfarbstoffes und der eigentlichen tierischen Peroxydasen;

b) der Umstand, daß die Peroxydasenwirkung an die Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd oder anderen Peroxyden geknüpft ist;

c) die Veränderlichkeit der hauptsächlich benutzten Reagenzien (Guajakharz, Terpentinöl), die durch die Bildung von Peroxyden in denselben verursacht wird;

---

[1]) W. Ewald, Die Physiologie der oxydativen Blutfermente. Pflügers Arch. 116, 334 (1907).

[2]) l. c.

[3]) l. c.

d) die praktische Schwierigkeit, Wirbeltierorgane von Blutresten so weit zu befreien, daß jede Interferenz zwischen Blut- und Peroxydasenwirkung ausgeschlossen wäre;

e) die vorerwähnte (von Lesser hervorgehobene) Hemmung der Guajakreaktion durch gewisse Organextrakte und leicht oxydable Substanzen;

f) die wenigstens vorläufig festzuhaltende Verschiedenheit der hier in Betracht kommenden Peroxydasen von den Katalasen einerseits, von direkten Oxydasen und glykolytischen Fermenten andererseits.

Es ergab sich also für uns die Notwendigkeit, die wichtigsten Angaben über die tierischen Guajakoxydasen unter Beachtung aller dieser Faktoren einer Revision zu unterziehen und Mittel und Wege zu finden, um die hier hervorgehobenen Fehlerquellen zu umgehen.

Weiter stellten wir uns das Ziel, tierische Oxydasen messenden Versuchen zugänglich zu machen; denn es war uns bald klar geworden, daß qualitative Versuche nicht ausreichen konnten, um einen tieferen Einblick in die hier vorliegenden komplizierten Verhältnisse zu gewinnen.

Schließlich bemühten wir uns, zu den in jüngster Zeit aufgerollten physiologisch wichtigen Fragen, betreffend die Oxydasennatur der Katalasen und glykolytischen Fermente Stellung zu nehmen.

Es sei uns nunmehr gestattet, zu einer Beschreibung unserer Versuche überzugehen.

2. Nachweis und Verbreitung tierischer Peroxydasen.

1. Guajakreaktion. Als erste Aufgabe ergab sich eine vergleichende Feststellung der Empfindlichkeitsgrenze der Guajakreaktion gegenüber Blut und Hämatinlösung.

Wir gingen nach der Vorschrift von Carlson[1]) bei Anstellung der Reaktion in der Weise vor, daß wir 3 ccm einer frisch bereiteten Guajakharzlösung (0,3 g in 10 ccm Alkohol) mit 2 ccm Wasserstoffsuperoxyd (3 Proz.) mischten und zu dem Gemenge 1 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit mittels Pipette unter vorsichtiger Schichtung hinzufügten. Die Blaufärbung der Bodenschicht kann so in bequemster Weise beobachtet werden.

a) Pferdeblut (nativ):

Verdünnung:	1: 2000	Reaktion:	stark positiv
	1: 4000	„	„ „
	1: 8000	„	schwach „
	1:16000	„	spurenweise.

[1]) l. c., S. 72.

b) Pferdeblut, gekocht:

Verdünnung:	1 : 2000	Reaktion:	stark positiv
„	1 : 4000	„	schwach „
„	1 : 8000	„	undeutlich.

c) Hämin (nach Mörners Verfahren aus Pferdeblut hergestellt):

Verdünnung:	1 : 5 000	Reaktion:	stark positiv
„	1 : 50 000	„	„ „
„	1 : 100 000	„	deutlich „
„	1 : 200 000	„	negativ.

d) Hämatin (aus Hämin durch Lösen in verdünnter Natronlauge und Fällen mit Essigsäure hergestellt; mit Hilfe von ein wenig Alkali in Wasser gelöst):

Verdünnung:	1 : 5 000	Reaktion:	stark positiv
„	1 : 50 000	„	„ „
„	1 : 100 000	„	schwächer, aber sehr deutlich
„	1 : 200 000	„	deutlich
„	1 : 400 000	„	negativ.

Der Versuch ergab demnach in Übereinstimmung mit Moitessier[1]), daß die Reaktion durch Kochen des Blutes nicht aufgehoben wird und an die Hämatinkomponente derselben geknüpft ist.

Zum Vergleiche untersuchten wir Eiter, den wir in frischem Zustande und ohne sichtbare Blutbeimengung von der chirurgischen Klinik erhalten hatten:

Verdünnung:	1 : 100	Reaktion:	stark positiv
„	1 : 200	„	„ „
„	1 : 400	„	schwach, aber deutlich
„	1 : 800	„	undeutlich.

Wurden die Eiterproben aufgekocht, so fiel die Reaktion in allen Fällen negativ aus.

Zur Untersuchung auf Organoxydasen wurde ein frisch getöteter Frosch mit Hilfe einer in die Aorta eingebundenen Kanüle so lange mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült, bis die aus der Bauchvene abfließende Flüssigkeit farblos erschien. Sodann wurden Stückchen der Organe mit Sand verrieben und die Suspension nach Carlson geprüft. Mit der Leber und den Muskeln fiel die Probe negativ aus. Auch die Lunge ließ die Reagenzlösung ungefärbt; dagegen nahmen die Organstückchen selbst eine blaue Färbung an. Die Betrachtung mit der Lupe lehrte, daß diese Färbung nicht etwa eine diffuse war, sondern dem verästelten Verlaufe von mit geronnenen Blutresten gefüllten Gefäßchen entsprach.

---

[1]) l. c.

Ebensowenig wie beim Frosch gelang uns eine vollkommene Entblutung der Organe eines Kaninchens, trotzdem wir noch vor der Verblutung das Blut durch intravenöse Infusion physiologischer Kochsalzlösung stark verdünnt hatten. Bedenkt man, welche minimale Mengen des Blutfarbstoffs bei richtig angestellter Probe mit Hilfe der Guajakreaktion noch nachgewiesen werden und daß die Organe auch Hämatin als solches (Myohämatin usw.) enthalten können, so wird man es ohne weiteres begreiflich finden, daß wir die Reaktion mit Milz, Lunge, Leber, Niere und Muskeln sowohl direkt, aber auch nach vorherigem Kochen der Organe positiv ausfallen sahen. Selbst anhaltende Durchspülung einer Lunge mit physiologischer Kochsalzlösung erwies sich unvermögend, alle Blutreste zu entfernen.

Wir gelangten zur Überzeugung, daß die Guajakmethode zur Untersuchung der Organe von solchen Tieren, welche in ihrem Blute Hämoglobin führen, durchaus ungeeignet ist, und vermögen daher den auf die Verbreitung und Lokalisation der Organoxydasen gemachten Angaben früherer Autoren (s. oben S. 360), insoweit sie auf diesem Untersuchungsverfahren basieren, keinerlei Beweiskraft zuzuerkennen. Selbst der (in der Regel gar nicht geführte) Nachweis, daß Kochen die angebliche Fermentwirkung aufhebt, ist nicht einwandfrei, da kleine Blutmengen von den voluminösen geronnenen Eiweißmassen eingeschlossen und so ausgeschaltet werden können.

Auch der Nachweis, daß manche Organe die Reaktion mit Guajaktinktur bereits ohne Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd geben, ist ohne besonderen Wert.

Wir haben uns davon überzeugt, daß blutfreier Eiter mit frisch bereiteter Lösung reiner Guajakonsäure (Merck) keine Reaktion gibt, also keine „direkte Oxydase" enthält; der Zusatz einer minimalen Menge Hydroperoxyds ist für den Eintritt der Reaktion unerläßlich; wir stimmen jenen Autoren bei, welche in den bei der Guajakreaktion in ihrer älteren Form benutzten Reagenzien (Guajakharz, Terpentinöl) die Bildung von Peroxyden beim Aufbewahren derselben annehmen[1]). Will man daher bei Fermentversuchen mit der Guajakreaktion unter klaren und durchsichtigen Verhältnissen arbeiten, so ist es unseres Er-

[1]) Vgl. das Sammelreferat von Bach und Chodat (l. c., S. 458): „Frisch dargestellte Guajaktinktur wird durch (pflanzliche) Peroxydasen nicht gebläut. Schon nur einige Stunden alte Guajaktinktur färbt sich dagegen mit Peroxydaselösung mehr oder weniger blau."

achtens unerläßlich, frisch bereitete reine Guajakonsäurelösung unter Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zu benutzen.

2. Reaktion mit Jodkalium. Es ergab sich nunmehr die Notwendigkeit, zum Nachweise tierischer Peroxydasen ein Reagens ausfindig zu machen, das mit dem Blutfarbstoff nicht reagiert. Die verschiedenen zyklischen Verbindungen, welche zum Zwecke des Fermentnachweises in der Pflanzenphysiologie gelegentlich Verwendung gefunden haben, wie das Phenylendiamin, das Phenolphtalin, das Pyrogallol usw., verhalten sich dem Hämoglobin gegenüber ebenso wie die Guajakonsäure, waren daher für unseren Zweck ebensowenig brauchbar.

Dagegen fanden wir in der Jodwasserstoffsäure ein empfindliches Peroxydasenreagens, das mit dem Hämoglobin und Hämatin nicht reagiert.

Die sich bereits bei Zimmertemperatur vollziehende Oxydation einer schwach angesäuerten Jodkaliumlösung durch Wasserstoffsuperoxyd wird, wie seit langer Zeit bekannt, durch pflanzliche Peroxydasen erheblich beschleunigt. Das dabei frei werdende Jod kann durch Stärkekleister nachgewiesen, sowie durch Thiosulfatlösung titrimetrisch bestimmt werden. Diese Reaktion ist von Bach und Chodat[1]) bei ihren zahlreichen wichtigen Untersuchungen zum genaueren Studium pflanzlicher Peroxydasen in mannigfacher Weise benutzt worden.

Die Unfähigkeit des Hämoglobins und des Hämatins, die Oxydation der Jodwasserstoffsäure durch Wasserstoffsuperoxyd zu beschleunigen, ergibt sich aus folgendem Versuche:

Verdünnte Jodkaliumlösung wird mit löslicher Stärke und mit sehr wenig Essigsäure versetzt und das Gemenge auf eine Anzahl von Proben zu 2 ccm verteilt. Zu jeder derselben wird die zu prüfende Flüssigkeit und zuletzt 1 ccm verdünnten Wasserstoffsuperoxyds (fünf Tropfen 3 proz. Lösung auf eine Eprouvette voll Wasser) hinzugefügt, und zwar enthielt Probe a) keinen Zusatz, b) einige Tropfen Hämatinlösung 1 : 500, c) einige Tropfen einer schwach alkalischen Acethäminlösung 1:500, d) einige Tropfen Ochsenblut, e) einige Tropfen Menschenblut, g) einen Tropfen nativer pflanzlicher Peroxydasenlösung (nach Bach und Chodat aus Meerrettich dargestellt), h) einen Tropfen gekochter pflanzlicher Peroxydasenlösung, i) einen Tropfen nativen Eiters (aus einem incidierten Abszeß entnommen), k) einen Tropfen gekochten Eiters. Die Proben g) und i) nehmen innerhalb weniger Sekunden eine tiefblaue Färbung an; alle anderen Proben waren dagegen noch nach $^{1}/_{2}$ Stunde unverändert.

---

[1]) Bach und Chodat, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **35**, 2467, 3943 (1902); **36**, 600, 606, 1756 (1903); **37**, 36, 1342, 2434, 3785, 3787 (1904); **38**, 1878 (1905); **39**, 1664, 1670, 2126 (1906); **40**, 230 (1907).

Die Reaktion war also nur von den nativen (nicht gekochten) Peroxydasen des Pflanzenextraktes und des Eiters, nicht aber vom Hämoglobin und vom Hämatin ausgelöst worden.

Es ergab sich weiterhin, daß die Wirksamkeit des Eiters eine hochgradige ist und selbst bei weitgehender Verdünnung nachgewiesen werden kann:

Frischer dicker Eiter wird mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Versuchsanordnung wie oben.

Verdünnung:	1: 100:	Starke Bläuung innerhalb weniger Sekunden
„	1: 200	„ „ jedoch merklich später
„	1: 400	Schwächere Blaufärbung nach etwa 1 Minute
„	1: 800	Schwache „ „ $1^1/_2$ Minuten
„	1:1600	Blaufärbung sehr schwach, der Kontrollprobe gegenüber jedoch deutlich
„	1:3200	Keine deutliche Reaktion mehr.

In Übereinstimmung mit Abelous[1]), Slowzoff[2]) und N. Sieber[3]) gelang es uns, die Peroxydase durch Neutralsalzlösungen aus dem Eiter zu extrahieren; wir benutzten zu diesem Zwecke Kochsalz- und Kaliumnitratlösungen verschiedener Konzentrationen. Gute Resultate erzielten wir ferner mit einem Gemenge von Chlorcalcium (1 Proz.) und cholsaurem Natron (0,3 Proz.), sowie auch mit Fluornatrium (2 Proz.), das infolge seiner antiseptischen Wirkung eine langdauernde Mazeration des Eiters bei Brutofentemperatur gestattete.

Versuche, dieses Ferment in der üblichen Weise durch Alkoholfällung zu reinigen, gaben unbefriedigende Resultate. Dasselbe scheint gegen Alkohol ziemlich empfindlich zu sein; dagegen ist es gegenüber erhöhter Temperatur auffallend widerstandsfähig; wir haben uns davon überzeugt, daß Fermentlösungen, die bis auf die Nähe des Siedepunktes erhitzt worden waren, dabei tatsächlich einen Teil ihrer Wirksamkeit noch bewahren konnten.

Hämatinzusatz vermag die Wirkung der Eiteroxydase weder zu fördern noch zu hemmen.

Dagegen wird die Reaktion durch größere Eiweißmengen erheblich gestört, offenbar, weil eine Addition des Jods an die Eiweißkörper erfolgt und die Bildung blauer Jodstärke infolgedessen ausbleibt. Ist die Peroxydase sehr kräftig, so vermögen selbst große Eiweißmengen ihre Wirkung nicht zu maskieren. Dagegen

---

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.

haben wir beobachtet, daß die Wirkung eines schwächer wirksamen Eiterextraktes durch den Zusatz des gleichen Volumens Blutserum vollständig aufgehoben wurde.

Natürlicherweise wird der Wert der Reaktion für die Auffindung von Peroxydasen in Geweben dadurch in dem Sinne eingeschränkt, daß nur ein positiver Befund, nicht aber ein negativer, Beweiskraft besitzt.

Unsere Erfahrungen hinsichtlich der Verbreitung der Organoxydasen lassen sich mit der vorerwähnten Einschränkung kurz dahin zusammenfassen, daß Peroxydasen in den sogenannten lymphoiden Geweben verschiedener Säugetiere (Knochenmark, Milz, Lymphdrüsen) mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten; und ebenso in Fischhoden.

In der Deutung negativer Befunde ist um so mehr Vorsicht geboten, als außer Eiweißkörpern sicherlich auch andere Jod addierende Substanzen (z. B. ungesättigte Fettsäuren) die Reaktion stören, derart, daß sich die Peroxydasen in fermentärmeren Organen leicht dem Nachweise entziehen können.

Daß die tierischen Peroxydasen intracelluläre Enzyme sind und nicht etwa der die Gewebe durchtränkenden Flüssigkeit angehören, ergibt die unmittelbare Beobachtung: Stets färben sich die geformten Partikel zuerst, und erst von diesen aus teilt sich die Färbung der umgebenden Flüssigkeit mit.

3. Methoden zur Messung der Peroxydasenwirkung.

Da die Funktion tierischer Peroxydasen bisher, soweit es uns bekannt ist, nicht Gegenstand genauerer messender Versuche geworden war, stellten wir uns nunmehr die Aufgabe, die peroxydasenähnliche Wirkung des Hämatins einerseits, einer tierischen Oxydase andererseits vom fermentchemischen Standpunkte miteinander zu vergleichen und die dabei gewonnenen Erfahrungen den hinsichtlich der pflanzlichen Peroxyde bereits vorliegenden Beobachtungen an die Seite zu stellen.

Zur Messung der Wirksamkeit pflanzlicher Peroxydasen sind eine Reihe von Methoden empfohlen worden.

Laborde[1]) versuchte, um die Oxydase eines auf Most wuchernden Pilzes zu messen, die durch Guajaktinktur entstandene Färbung im Dubosqschen Kolorimeter mit jener zu vergleichen, welche Jod mit diesem

[1]) Laborde, Oxydase de Botrytis cinerea. Compt. rend. **126**, 536 (1898).

Reagens hervorruft; doch wurde diese Methode von Alliot und Pozzi-Escot[1]) als völlig wertlos verworfen.

Slowzoff[2]) benutzte die Indophenolreaktion zu einer ungefähren Schätzung der Beziehungen zwischen Konzentration und Wirkung von Enzymen, die er aus Kartoffeln und Kohl bereitet hatte; Kastle und Shedd[3]) empfahlen zu einem ähnlichen Zwecke die Umwandlung von Phenolphthalin in Phenolphtaleïn.

Schließlich haben Bach und Chodat[4]) ihre zahlreichen quantitativen Untersuchungen einerseits auf die titrimetrische Bestimmung des aus angesäuerter Jodkaliumlösung abgespaltenen Jods, andererseits auf die gewichtsanalytische Bestimmung des schwer löslichen Purpurogallins basiert, welches durch Oxydation aus Pyrogallol entsteht.

Da es für uns darauf ankam, eine Methode zu wählen, welche in gleicher Weise geeignet sein sollte, die peroxydasenähnliche Wirkung des Hämatins, wie die Leistungen echter tierischer Peroxydase messend zu verfolgen, kam die Jodkaliummethode, welche ja auf den Blutfarbstoff nicht anwendbar ist, nicht in Betracht. Auch hätte der Umstand, daß sich bei dem Verfahren die Gegenwart von Eiweiß durch Jodbindung störend geltend macht, gegen eine Anwendung desselben gesprochen. Die minimalen Eiweißmengen in den pflanzlichen Peroxydasepräparaten von Bach und Chodat konnten sicherlich vernachlässigt werden; doch gilt dies nicht für die eiweißreichen Eiterextrakte, die unser Arbeitsmaterial bildeten. Auch veranlaßten uns die günstigen Erfahrungen, welche der eine[5]) von uns bei messenden Versuchen mit dem Tyrosinaseferment gemacht hatte, einer kolorimetrischen, insbesondere aber einer spektrophotometrischen Methode einer titrimetrischen gegenüber den Vorzug zu geben.

Wir haben zahlreiche Versuche mit dem Phenolphtalinverfahren von Kastle und Shedd (siehe oben) ausgeführt. Wir fanden, daß die rote alkalische Phenolphtaleïnlösung sich vortrefflich zur spektrophotometrischen Messung eignet, da sie einen scharf begrenzten Absorptionsstreifen etwa in der Mitte des Spektrums aufweist. Wenn wir dieses Verfahren später wieder verlassen

---

[1]) H. Alliot und E. Pozzi-Escot, Zur Bestimmung der Diastasen, insbesondere über kolorimetrische Bestimmung der Oxydasen. Ann. chim. anal. appl. 7, 210. Ref. Chem. Centralbl. 2, 305 (1902).

[2]) Slowzoff, Zur Kenntnis der pflanzlichen Oxydasen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 227 (1900).

[3]) Kastle and Shedd, Phenolphtalin as a reagent for the oxydising ferments. Amer. chem. Journ. 26, 26 (1901).

[4]) l. c.

[5]) O. v. Fürth und E. Jerusalem, Zur Kenntnis der melanotischen Pigmente und der fermentativen Melaninbildung. Diese Beiträge 10, 131 (1907).

haben, so geschah dies wegen des Umstandes, daß sich eine alkalische farblose Phenolphtalinlösung auch bei Abwesenheit einer Peroxydase bereits spontan, d. h. durch die Wirkung des Luftsauerstoffs, langsam, bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd aber sehr schnell rötet. Diese spontane Veränderung muß bei messenden Versuchen stets rechnerisch in Betracht gezogen werden und beeinträchtigt die Verwendbarkeit der Methode in hohem Grade.

Wir glauben es daher als einen wesentlichen methodischen Fortschritt bezeichnen zu dürfen, daß wir im Leukomalachitgrün ein Reagens gefunden haben, welches die Vorzüge des Phenolphtalins in sich vereint, ohne aber dessen Nachteile zu besitzen.

Die Leukobase des Malachitgrüns, ihrer chemischen Zusammensetzung nach ein Tetramethyldiamidotriphenylmethan,

$$C_6H_5 . CH [C_6H_4N(CH_3)_2]_2,$$

wurde von O. und R. Adler[1]) als äußerst empfindliches Reagens zum Blutnachweise empfohlen, da eine in geeigneter Weise bereitete farblose Lösung desselben bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd bereits durch minimale Hämoglobinmengen in Malachitgrün umgewandelt wird.

Wir haben nun gefunden, daß eine essigsaure Leukomalachitgrünlösung[2]) nach Zusatz von etwas Wasserstoffsuperoxyd ein vortreffliches Reagens zum Nachweise nicht nur von Hämoglobin, sondern auch von Peroxydasen bildet. Die farblose oder sehr schwach grünlich gefärbte Reagenzlösung bleibt selbst nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd sehr lange Zeit hindurch unverändert. Setzt man aber ein wenig von der Lösung einer tierischen oder pflanzlichen Peroxydase hinzu, so bemerkt man alsbald das Auftreten einer smaragdgrünen Färbung, welche sich, je nach den Versuchsbedingungen, mehr oder weniger schnell vertieft.

Es hat sich weiterhin herausgestellt, daß die Menge des aus der Leukobase durch Fermentwirkung neu entstandenen Malachitgrüns auf spektrophotometrischem Wege mit großer Genauigkeit quantitativ ermittelt werden kann, und dies um so bequemer, als eine passend verdünnte Malachitgrünlösung einen scharf begrenzten Absorptionsstreifen im mittleren Teile des Spektrums aufweist.

---

[1]) l. c.

[2]) Wir sind der Großdrogerie des Herrn Adler in Karlsbad für die freundliche Beistellung eines nach den Vorschriften der Herren O. und R. Adler bereiteten Präparates der Leukobase zu besonderem Danke verpflichtet.

Eine alkoholische 0,007 09 proz. Malachitgrünlösung gab bei Beobachtung mit einem Glanschen Spektrophotometer älterer Konstruktion (von Schmidt u. Hänsch in Berlin):

a) bei einer Verdünnung auf $C/2$ einen Extinktionskoeffizienten $E = 1{,}288$
b) „ „ „ „ $C/4$ „ „ „ 0,614
c) „ „ „ „ $C/10$ „ „ „ 0,248

woraus sich nach der Formel $A = \frac{C_1}{E_1} = \frac{C_2}{E_2} = \frac{C_3}{E_3} \cdots$ für A die Werte

$$\left.\begin{array}{l} \text{a) } 0{,}000\,028\,9 \\ \text{b) } 0{,}000\,028\,8 \\ \text{c) } 0{,}000\,028\,5 \end{array}\right\} \text{ im Mittel } 0{,}000\,028\,7$$

ergaben.

Der Absorptionskoeffizient einer Malachitgrünlösung ist sonach zu 0,000 028 7 festgestellt worden.

Eine einfache spektrophotometrische Messung gestattet sonach die quantitative Bestimmung der in dem gegebenen Augenblicke in der Lösung vorhandenen absoluten Malachitgrünkonzentration nach der Formel $C = AE$, wobei E mit Hilfe einer einfachen Formel (für das Glansche Spektrophotometer $E = -2\,(\log\cot\alpha + \log\operatorname{tang}\beta)$ aus der beobachteten Winkelstellung des Nicols berechnet wird.

Da eine solche Beobachtung bei einiger Übung in wenigen Augenblicken beendigt ist, zudem beliebig oft und in beliebigen Zeitabständen mit derselben Probe wiederholt und mit wenigen Cubikcentimetern Flüssigkeit ausgeführt werden kann, brauchen wohl die Vorzüge dieser Methode für die Messung animalischer Peroxydasen nicht weiter hervorgehoben zu werden.

4. Messende Versuche über die peroxydasenartige Wirkung des Hämatins.

Mit Hilfe der oben beschriebenen Methode gingen wir nun an die Aufgabe heran, die peroxydasenartige Wirkung des Hämatins messend zu verfolgen.

Nachdem durch Vorversuche eine zweckmäßige Wahl der Versuchsbedingungen ermittelt worden war, führten wir Serienversuche in der Art aus, daß wir die Konzentration a) des Hämatins oder b) des Wasserstoffsuperoxyds oder c) des Leukomalachitgrüns variierten, die anderen Faktoren aber unverändert beließen.

Es möge uns gestattet sein, hier von jedem Versuchstypus ein Beispiel mitzuteilen.

a) Variation der Hämatinmenge.

Jede Probe enthielt 20 ccm einer 0,208 proz. Leukomalachitgrünlösung (durch Auflösen von 1,040 g der Leukobase in 50 ccm Eisessig und Auffüllen auf 500 ccm hergestellt) und 1 ccm 0,153 n-H_2O_2, ferner:

a) 2 ccm Acethäminlösung 1 : 5000 unverdünnt
b) " " " auf $^1/_2$ mit H_2O verdünnt
c) " " " " $^1/_5$ " " "
d) " " " " $^1/_{10}$ " " "
e) " " " " $^1/_{20}$ " " "

In der nebenstehenden Tabelle bezieht sich die Zeitangabe t auf den Moment des Zusatzes der katalysierenden Hämatinlösung; β bedeutet die beobachtete Nicoleinstellung, vom Nullpunkte des Apparates aus gerechnet und als Winkelwert gemessen; α den Helligkeitspunkt (also jene Nicolstellung, welche der maximalen Helligkeit, wenn sich keine Licht absorbierende Flüssigkeit vor dem Spalte befindet, entspricht); E den nach der Formel $E = -2(\log \cot \alpha + \log \tan \beta)$ berechneten Extinktionskoeffizienten, welcher (der Relation $C = AE$ entsprechend) ein direktes Maß für die relative Menge der in der Flüssigkeit zur Zeit der Beobachtung vorhandenen Malachitgrünmenge bildet; c eine mit Hilfe einer Kontrollprobe berechnete Korrektur für jene Malachitgrünmenge, welche in diesem Falle von vornherein im Reagens vorhanden war, derart, daß nicht E, sondern $E - c$ ein Maß für die unter Einwirkung des Katalysators neu entstandene Malachitgrünmenge bildet.

Der Faktor k bedeutet das Verhältnis $\frac{\Delta(E-c)}{\Delta t}$, d. h. das Verhältnis der innerhalb eines Zeitintervalls neugebildeten Farbstoffmenge zur Länge dieses Zeitintervalls, also die Reaktionsgeschwindigkeit; dieselbe wurde aus je zwei Nachbarwerten der Kolonne $(E - c)$ berechnet und entspricht geometrisch der Steilheit jener Kurve, welche man erhält, wenn man die Zeit als Abszisse, die Verhältniszahlen für die neugebildete Malachitgrünmenge $(E - c)$ als Ordinate aufträgt.

In der Fig. 1 sind die Resultate der Versuchsreihe graphisch registriert.

Ein Blick auf die Figur lehrt, daß der Kurvenverlauf in erster Annäherung geraden Linien entspricht. Nur im Beginn der Reaktion macht sich ein etwas zögerndes Einsetzen derselben durch eine Ausbauchung der Kurven kenntlich, eine Beobachtung, die bei physikalisch-chemischen Versuchen häufig wiederkehrt. Je weiter sich aber die Kurven vom Koordinatenanfangspunkte entfernen, desto mehr nähern sie sich einer Geraden, desto mehr kommen, wie ein Vergleich der Zahlen der letzten Kolonne lehrt, die Werte k, d. h. die Näherungswerte für den Differentialquotienten $\frac{dy}{dt}$ einem konstanten Werte nahe, bis die Unterschiede schließlich praktisch in die Fehlergrenzen fallen.

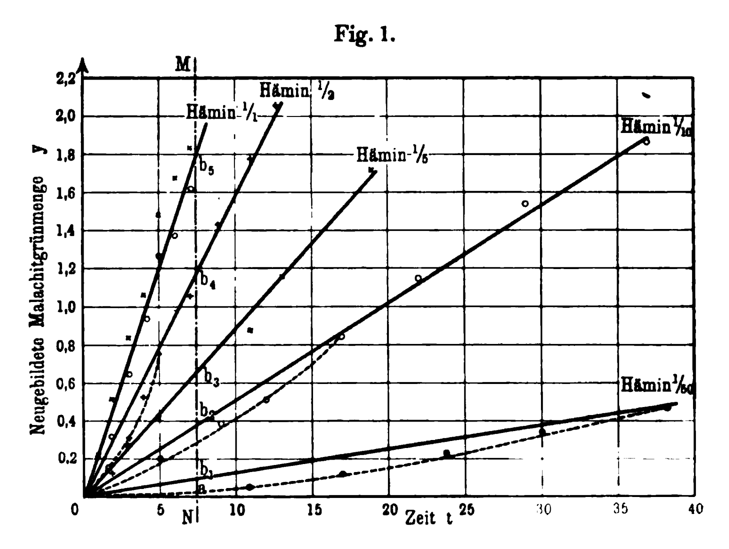
Konzentr. des Hämins	Zeit t Minuten	Nicol-ablesung β Grad	Extinktions-koeffizient E	Korrigierter Extinktions-koeffizient $E-c$	Reaktions-geschwindigkeit k	
1/1	1	42,7	0,338	0,216	0,216	
	2	33,3	0,634	0,512	0,256	
	3	24,6	0,946	0,824	0,274	
	4	19,2	1,184	1,062	0,265	Mittel 0,272
	5	13,5	1,508	1,486	0,297	
	6	9,7	1,802	1,680	0,280	
	7	8,1	1.962	1,840	0,263	
1/1	1	46,9	0,210	0,088	0,088	
	2	39,6	0,432	0,310	0,155	
	3	29,2	0,774	0,652	0,217	
	4	21,7	1,068	0,946	0,237	
	5	15,3	1,394	1,272	0,254	
	6	13,1	1,494	1,372	0,228	Mittel 0,236
	7	10,5	1,732	1,610	0,230	
	8	8,1	1 962	1,840	0,230	
1/2	1	47,6	0,190	0,068	0,068	
	2	45,7	0,246	0,124	0,062	
	3	40,0	0,420	0,298	0,099	
	4	32,6	0,656	0,534	0,123	
	5	26,1	0,888	0,766	0,153	
	7	19,3	1,180	1,058	0,151	
	9	12,9	1,556	1,434	0,159	Mittel 0,157
	11	8,7	1,898	1,776	0,161	
	13	6,2	2,196	2,074	0,159	
1/5	3	39,1	0,448	0,326	0,109	
	5	36,2	0,540	0,428	0,086	
	11	23,1	1,008	0,886	0,081	
	13	17,1	1,292	1,170	0,090	Mittel 0,085
	16	13,3	1,520	1,398	0,087	
	19	9.2	1,848	1,726	0,080	
1/10	5	46,7	0,320	0,198	0,040	
	9	40,2	0,422	0,300	0,033	
	12	33,3	0,632	0,510	0,042	
	17	23,5	0,998	0,876	0,051	
	22	17,2	1,286	1,164	0,053	Mittel 0,052
	29	11,2	1,674	1,552	0,053	
	37	7,7	1,992	1,870	0,050	
	11	47,6	0,190	0,068	0,006	
	17	46,1	0,234	0,112	0,007	
	24	41,6	0,372	0,260	0,011	
	30	38,6	0,464	0,342	0,011	Mittel 0,012
	38	34,1	0,606	0,484	0,013	

$c = 0{,}122$ $\alpha = 53{,}7^{\circ}$

Von unwesentlichen Abweichungen abgesehen, ist **sonach bei der durch das Hämatin eingeleiteten Reaktion die Menge der innerhalb eines Zeitintervalles gebildeten Oxydationsprodukte der Größe desselben annähernd proportional.**

Fragen wir nun weiter, inwiefern der Kurvenverlauf durch die relative Menge des Hämatins beeinflußt wird, so ergibt sich ohne weiteres, daß den größeren Hämatinmengen ein steilerer Kurvenverlauf entspricht. Man könnte nun vielleicht erwarten, daß die Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Kurven, $k = \frac{dy}{dt}$, der Hämatinkonzentration direkt proportional sei, derart also, daß z. B.

Fig. 1.



bei fünffacher Hämatinkonzentration die Reaktion mit fünffacher Geschwindigkeit abläuft, also innerhalb des gleichen Zeitraumes die fünffache Malachitgrünmenge gebildet werde. Zieht man aber an einem beliebigen Punkte der Abszisse eine gerade Linie MN parallel zur Ordinatenachse und betrachtet nun die Strecken ab_1, ab_2, ab_3 . . ., welche durch die einzelnen Linien auf dieser Ordinate abgeschnitten werden, so lehrt die einfache Betrachtung, daß z. B. der Abschnitt ab_5 (Hämatinkonzentration: $^1/_1$) nicht zehnmal, sondern nur etwa fünfmal größer ist, als der Abschnitt ab_2 (Hämatinkonzentration $^1/_{10}$).

Der rechnerische Vergleich der mittleren Grenzwerte für k ergibt:

$$\left\{\begin{array}{ll} \text{Hämatinkonzentration:} & 1/1 : 1/2 : 1/5 : 1/10 : 1/50 \\ k \ldots\ldots\ldots \begin{matrix}0{,}272\\0{,}236\end{matrix}\Big\} & 0{,}259 : 0{,}157 : 0{,}085 : 0{,}052 : 0{,}012 \end{array}\right.$$

oder aber übersichtlicher:

$$\left\{\begin{array}{ll} \text{Hämatinkonzentration:} & 1 : 0{,}5 : 0{,}2 : 0{,}1 : 0{,}02 \\ k \ldots\ldots\ldots\ldots & 1 : 0{,}60 : 0{,}33 : 0{,}20 : 0{,}05 \end{array}\right.$$

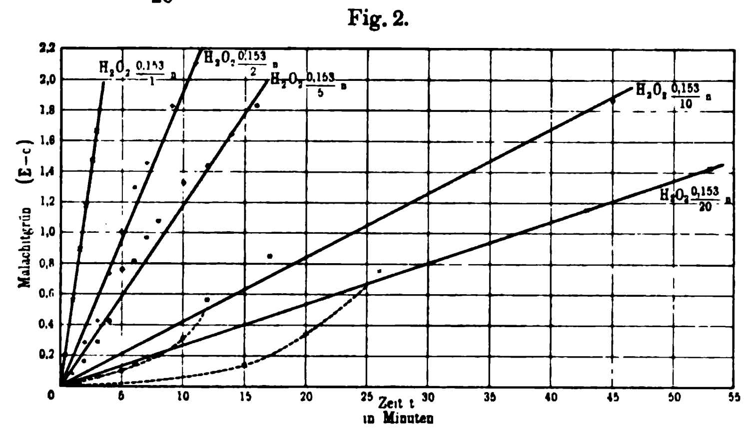
Die Abnahme der Geschwindigkeitskonstanten mit der Hämatinkonzentration erfolgt also nicht dieser proportional, sondern erheblich langsamer.

Es sei hier noch bemerkt, daß in diesem, sowie auch in den späteren Versuchen die im Reaktionsgemisch befindliche Leukomalachitgrünmenge so groß gewählt war, daß der bei der Reaktion verbrauchte Bruchteil derselben als verschwindend klein betrachtet werden durfte.

b) Variation der Wasserstoffsuperoxydkonzentration.

Jede Probe enthielt 20 ccm Leukomalachitgrünlösung (0,208 Proz., s. oben) und 1 ccm Acethäminlösung (1 : 50 000), ferner a) 1 ccm H_2O_2 $\frac{1{,}53}{1}$ norm.; b) 1 ccm H_2O_2 $\frac{1{,}53}{2}$ norm.; c) 1 ccm H_2O_2 $\frac{1{,}53}{5}$ norm.; d) 1 ccm H_2O_2 $\frac{1{,}53}{10}$ norm.; e) 1 ccm H_2O_2 $\frac{1{,}53}{20}$ norm.

Fig. 2.



Auch hier begegnet uns wieder bei Betrachtung der Kurven ihre Tendenz zu einem geradlinigen Verlaufe, die, je weiter sie sich vom Koordinatenanfangspunkte entfernen, um so klarer hervortritt, während der Anfangsteil der Kurve, abgesehen von den durch Versuchsfehler bedingten Unregelmäßigkeiten, auch hier die oben erwähnten Ausbauchungen aufweist.

Wasserstoffsuperoxyd	t Minuten	β Grad	E	$E-c$	k	
1 ccm $\frac{1,53}{1}$ n-H_2O_2	½	40,5	0,328	0,200		
	1	29,3	0,692	0,564	0,564	
	1½	21,1	1,018	0,890	0,593	
	2	15,3	1,316	1,188	0,594	Mittel 0,577
	2½	11,2	1,596	1,468	0,583	
	3	9,1	1,780	1,652	0,551	
1 ccm $\frac{1,53}{2}$ n-H_2O_2	1	44,3	0,212	0,084		
	2	37,9	0,408	0,280	0,140	
	3	33,4	0,552	0,424	0,141	
	4	24,5	0,872	0,744	0,186	
	5	18,6	1,136	1,008	0,202	Mittel 0,201
	6	13,6	1,422	1,294	0.216	
	7	11,4	1,580	1,452	0,207	
	9	7,5	1,952	1,824	0,203	
	11	5,3	2,256	2,128	0,194	
1 ccm $\frac{1,53}{5}$ n-H_2O_2	2	41,5	0,296	0,168	0,084	
	3	37,6	0,416	0,288	0,096	
	4	33,3	0,556	0,428	0,107	
	5	25,5	0,834	0,706	0,141	
	6	22,9	0,938	0,810	0,135	
	7	19,5	1,092	0,964	0,137	Mittel 0,127
	8	17,3	1,204	1,076	0,135	
	10	13,1	1,456	1,328	0,133	
	12	11,6	1,566	1,438	0,119	
	14	9,2	1,772	1,644	0,117	
	16	7,5	1,952	1,824	0,114	
1 ccm $\frac{1,53}{10}$ n-H_2O_2	1	46,2	0,144	0,016	0,016	
	3	45,4	0,178	0,050	0,017	
	5	43,5	0,236	0,108	0,021	
	6	42,4	0,270	0,142	0,024	
	8	40,6	0,324	0,196	0,028	
	10	36,7	0,446	0,318	0,032	
	12	29,4	0,688	0,560	0,047	
	17	22,1	0,974	0,846	0,049	Mittel 0,046
	45	7,1	2,000	1,872	0,042	
1 ccm $\frac{1,53}{20}$ n-H_2O_2	15	42,4	0,270	0,142	0,010	
	20	35,9	0,470	0,342	0,017	
	26	24,3	0,880	0,752	0,029	
	43	15,8	1,286	1,158	0,027	Mittel 0,027
	53	11,7	1,558	1,430	0,027	
	75	7,8	1,916	1,788	0,024	

$c = 0,128$

$\alpha = 51,2^{0}$

Die Beziehung zwischen Wasserstoffsuperoxydkonzentration und den Geschwindigkeitskonstanten tritt hier mit großer Klarheit zutage. Führen wir für die k-Werte wiederum jene (in der letzten Kolonne berechneten) Mittelzahlen ein, welche den Kurvenverlauf in ihrem peripheren regelmäßigeren Anteile bestimmen, so ergibt sich:

H_2O_2 relative Konzentration	1	: 0,5	: 0,2	: 0,1	: 0,05
k	0,577	: 0,201	: 0,127	: 0,046	: 0,027
oder	1	: 0,35	: 0,22	: 0,08	: 0.05

Hier begegnen wir demnach einem Zahlenverhältnis, welches auf eine annähernde Proportionalität zwischen Wasserstoffsuperoxydkonzentration und den Geschwindigkeitskonstanten hindeutet, welche Gesetzmäßigkeit allerdings erst durch eine größere Anzahl von Versuchen festgestellt werden müßte.

c) Verdünnung der Leukobase.

Jede Probe enthielt 2 ccm Acethämin (1 : 50 000), ferner 1 ccm H_2O_2 $\frac{1,53}{1}$ norm.; außerdem:

Probe a) 20 ccm Leukomalachitgrün 0,208 Proz., unverdünnt
" b) " " " " " Verdünnung 1/2
" c) " " " " " " 1/10
" d) " " " " " " 1/20

Zur Verdünnung wurde, um einer Verschiebung der Acidität vorzubeugen, Essigsäure von jener Konzentration verwendet, wie sie in der Lösung der Leukobase vorhanden war.

Konzentr. der Leukobase	t Minuten	β Grad	E	$E-c$	k		
1/1	2	30,1	0,648	0,540			
	3	16,8	1,214	1,106	0,36	0,40	
	4	8,0	1,878	1,770	0,44		
1/2	1	34,3	0,506	0,398	0,40		$c = 0,108$
	2	22,9	0,922	0,814	0,41	0,42	
	3	13,2	1,432	1,326	0,44		
	4	8,7	1,804	1,696	0,42		
1/10	1	34.7	0,504	0,396	0,40		
	2	18,5	1,126	1,018	0,50	0,47	
	3	12,7	1,468	1,360	0,44		
	4	8,1	1,868	1,760	0,44		
1/20	1	40,9	0,298	0,190	0,29		
	2	28,8	0,694	0,586	0,31		$\alpha = 50,7°$
	3	20.5	1,028	0,920	0,29		
	4	15,6	1,288	1,180	0,27	0,28	
	5	13,1	1,440	1,332	0,27		
	6	10,2	1.664	1,556	0,27		
	7	8,1	1,868	1,760	0,25		

Die vorliegenden Zahlen zeigen deutlich, daß der Reaktionsverlauf von einer Konzentrationsveränderung der Leukobase auch nicht im entferntesten in so intensiver Weise beeinflußt wird, wie von einer Konzentrationsveränderung des Hämatins oder des Wasserstoffsuperoxyds. Selbst eine zehnfache Verdünnung der Leukobase hatte keine Verkleinerung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge; diese trat erst bei 20 facher Verdünnung in Erscheinung und hielt sich auch dann noch innerhalb bescheidener Grenzen.

Die mitgeteilten Versuche dürften zu einer ungefähren Orientierung über die hier obwaltenden Verhältnisse genügen, zum mindesten, insoweit eine solche zum Vergleiche mit den bei den echten Peroxydasen beobachteten Gesetzmäßigkeiten, zu deren Besprechung wir nunmehr übergehen, unerläßlich ist.

5. Messende Versuche über die Wirkungsart der Peroxydasen.

Um uns über die Wirkungsart der Peroxydasen im allgemeinen zu orientieren, verglichen wir zunächst solche pflanzlichen und tierischen Ursprunges.

Wir benutzten zu diesem Zwecke einerseits ein nach dem Verfahren von Bach und Chodat[1]) aus Meerrettichwurzeln hergestelltes Peroxydasenpräparat, andererseits ein Eiterextrakt.

Bei Herstellung der peroxydasenhaltigen Eiterextrakte kam es vor allem darauf an, jede Blutbeimengung zu vermeiden. Wir erhielten Eiter ohne sichtbare Blutbeimengung zum Teil von den chirurgischen Kliniken, zum Teil gewannen wir ihn auch derart, daß wir bei Hunden durch subkutane Injektion von Terpentinöl aseptische Eiterungen erzeugten und die Abszesse punktierten. Um jedoch eine Trübung der Versuchsresultate durch die Gegenwart von Blutfarbstoff mit Sicherheit auszuschließen, wurde der Eiter mit destilliertem Wasser aufgeschwemmt, wobei beigemengte rote Blutkörperchen in Lösung gingen, die überstehende Flüssigkeit nach einiger Zeit durch Dekantieren und Zentrifugieren abgetrennt und der Vorgang so lange wiederholt, bis keine Spur einer rötlichen Färbung im Waschwasser mehr sichtbar war. Der aus zerfallenen blutfreien Eiterzellen zusammengesetzte Rückstand wurde nunmehr mit einer Neutralsalzlösung (z. B. einem Gemenge von Kaliumnitrat 10 Proz. und Calciumchlorid 1 Proz.) extrahiert, wobei ein Teil der Peroxydase in Lösung ging.

Da die echten Peroxydasen gegen höhere Säuregrade empfindlich sind, mußten solche bei Bereitung der Lösung des Leukomalachitgrüns vermieden werden. Ein für unsere Zwecke geeignetes Reagens erhielten wir, indem wir 1 g der Leukobase unter

[1]) Bach und Chodat, l. c.

Zusatz von 50 ccm Eisessig lösten, die Lösung mit Wasser auf $^1/_2$ Liter auffüllten und diese Lösung sodann noch zehnfach mit Wasser verdünnten. Die von Malachitgrünbeimengung herrührende Eigenfärbung dieser Reagenzlösung war eine so minimale, daß sie vernachlässigt werden konnte.

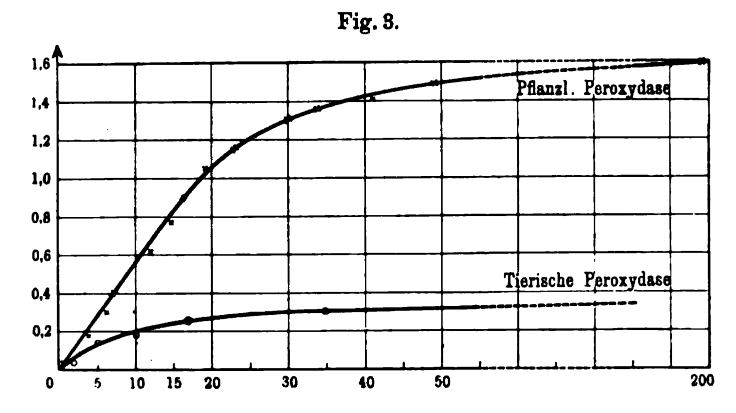
Die Proben enthielten 20 ccm der Leukobasenlösung (0,02 Proz.), 1 ccm H_2O_2 0,15 norm., sowie einige Cubikcentimeter der Fermentlösungen.

Peroxydase aus Meerrettich.

t Minuten	β Grad	E	$k = \frac{dy}{dt}$	t Minuten	β Grad	E	$k = \frac{dy}{dt}$
1	49,6	0,034	—	34	14,4	1,356	
4	44,7	0,188	0,062	41	13,6	1,406	0,011
6	40.5	0,312		49	12,2	1,504	
7	37,4	0,408	0,052	200	10,5	1,638	0,001
12	30,4	0,628		2	50,6	0,032	
14	26,4	0,782		5	46,8	0,148	0,018
16	23,2	0,906	0,062	10	45,5	0,188	
19	19,8	1,062		17	43,3	0,254	—
23	17,7	1,166	0,020	35	42,2	0,288	0,004
30	15,5	1,288		70	38,5	0,420	

Die prinzipielle Verschiedenheit dieser Kurven gegenüber den Hämatinversuchen springt auf den ersten Blick ins Auge: Während die Hämatinkurven die Tendenz haben, geradlinig zu ver-

Fig. 3.



laufen, sehen wir bei diesen, sowie bei allen weiter unten folgenden Peroxydaseversuchen die Kurven nach einem initialen, ziemlich stetigen Anstiege sich derart abflachen, daß sie nahezu der Abszisse parallel verlaufen. Es ist dies

eine Eigentümlichkeit, welche auch bereits Bach und Chodat[1]) bei Messung pflanzlicher Oxydasen mit Hilfe der Purpurogallin- und der Jodkaliummethode aufgefallen ist und welche der eine von uns (gemeinsam mit Jerusalem[2]) bei Versuchen mit Tyrosinasefermenten tierischen und pflanzlichen Ursprunges in ganz analoger Weise beobachtet hat.

Wir haben nun weiterhin auch mit der Eiterperoxydase Serienversuche in der Weise ausgeführt, daß wir die Konzentration entweder des Fermentes oder des Wasserstoffsuperoxyds oder aber der Leukobase variierten, die anderen Faktoren aber innerhalb derselben Versuchsreihe unverändert ließen.

a) Variation der Fermentkonzentration.

Jede Probe enthielt 20 ccm Leukobasenlösung (0,02 Proz.), 2 ccm H_2O_2 0,15 norm., ferner:

a) 2 ccm Ferment[3]) + 8 ccm H_2O
b) 5 „ „ 5 „ „
c) 10 „ „ 0 „ „

Fermentmenge	t Minuten	β Grad	E	Fermentmenge	t Minuten	β Grad	E
2 ccm	5	43,7	0,061	5 ccm	60	26,5	0,690
	19	41,9	0,176	10 ccm	1	31,5	0,508
	33	41,6	0,188		2	22,8	0,834
	60	38,6	0,278		3	20,7	0,928
5 ccm	3	37,4	0,316		6	16,4	1,114
	5	35,9	0,362		11	13,6	1,314
	12	33,0	0,458		16	12,4	1,398
	17	29,5	0,576		22	12,4	1,398
	31	28,5	0,612		41	12,9	1,362
	41	26,5	0,690				

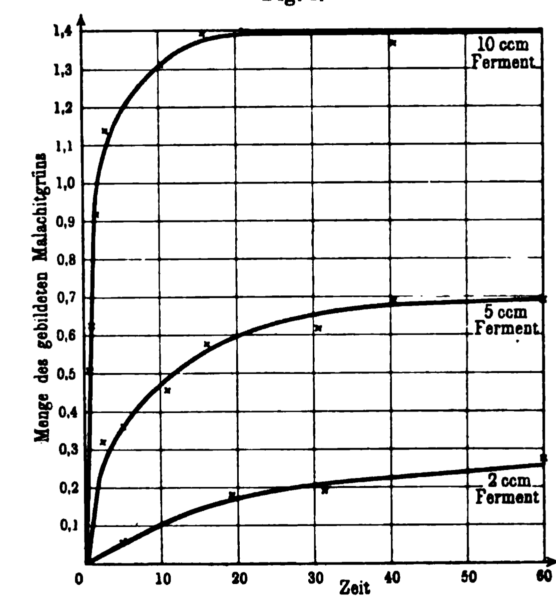
b) Variation der Wasserstoffsuperoxyd-Konzentration.

Jede Probe enthielt 20 ccm Leukobasenlösung (0,02 Proz.), ferner 2 ccm Eiterferment, ferner a) 1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{1}$ norm.; b) 1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{2}$ norm.; c) 1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{5}$ norm.

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) Die eiweißhaltige Fermentlösung gab mit der Leukobasenlösung infolge des Essigsäuregehaltes derselben einen flockigen Niederschlag, der vor Zusatz des Wasserstoffsuperoxyds bei diesem sowie den folgenden Versuchen beseitigt wurde.

H_2O_2	*t* Minuten	*β* Grad	*E*	H_2O_2	*t* Minuten	*β* Grad	*E*
1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{1}$ norm.	1	45,9	0,060	1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{2}$ norm.	10	28,4	0,622
	2	39,5	0,256		12	27,4	0,658
	3	34,8	0,404		24	27,4	0,658
	5	30,9	0,534		32	27,4	0,658
	7	27,6	0,652	1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{5}$ norm.	2	46,9	0,030
	9	26,0	0,712		4	43,5	0,132
	13	24,4	0,774		8	37,5	0,318
	22	25,5	0,732		13	32,7	0,474
1 ccm H_2O_2 $\frac{0,15}{2}$ norm.	1	46,3	0,048		22	30,5	0,548
	2	42,5	0,164		29	28,4	0,622
	4	34,8	0,404		35	28,9	0,604
	6	31,3	0,520				

Fig. 4.



c) Variation der Leukobasen-Konzentration.

Jede Probe enthält 2 ccm Fermentlösung, 1 ccm H_2O_2 0,15 norm., ferner:

a) 20 ccm Leukobasenlösung 0,02 Proz., unverdünnt,

b) „ „ „ „ „ auf $^1/_2$ verdünnt,

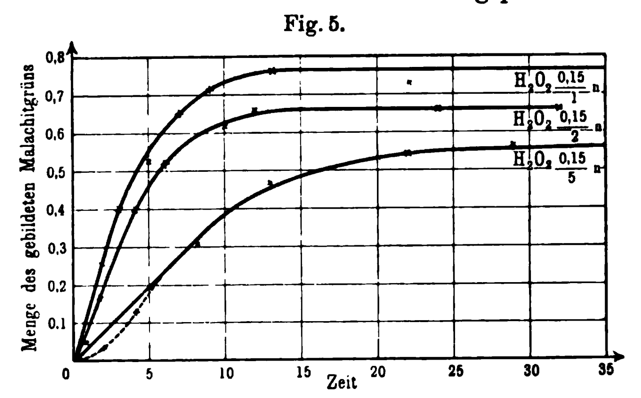
c) „ „ „ „ „ „ $^1/_5$ „

Zur Verdünnung diente eine Essigsäure von der in dem Reagens vorhandenen Konzentration.

Leukobasen-konzentr.	t Minuten	β Grad	E
1/1	vgl. den ersten Versuch der vorigen Serie		
1/2	3	43,5	0,136
	5	38,4	0,290
	7	35,8	0,376
	9	35,2	0,390
	17	35,4	0,384
1/5	8	46,9	0,030
	22	42,8	0,154
	35	42,2	0,174

Die nähere Betrachtung dieser Kurven lehrt, daß hier die Verhältnisse wesentlich anders liegen, als bei der durch das Hämatin eingeleiteten Reaktion. Außer dem bereits oben erwähnten prinzipiellen Unterschiede, daß nämlich die Hämatinreaktionen im wesentlichen durch gerade Linien dargestellt werden, welche sich unter verschiedenen Winkeln vom Koordinatenanfangspunkte entfernen,

Fig. 5.



während die Peroxydasekurven nach einem mehr oder minder steilen Anstiege umbiegen und der Abszisse parallel verlaufen, werden auch beide Reaktionen durch verschiedene Faktoren in verschiedenem Sinne beeinflußt.

Steigerung der Fermentkonzentration ist (vgl. Fig. 4) von so ausschlaggebender Wirkung, daß in unserem Versuche das schließlich erreichte Maximal-Kurvenniveau derselben annähernd proportional war:

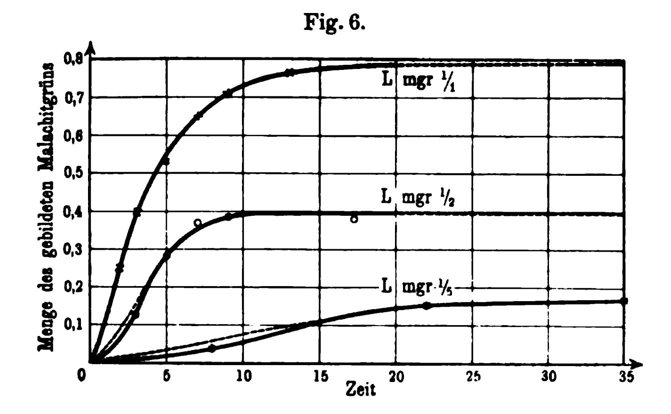
Fermentkonzentration 1 : 2,5 : 5
Kurvenmaximum . . 0,278 : 0,690 : 1,362 = 1 : 2,5 : 4,9

Das gleiche gilt für die Variation der Konzentration der Leukobase; während eine solche beim Hämatin den Kurvenverlauf innerhalb sehr weiter Grenzen praktisch unbeeinflußt ließ, beobachteten wir (trotzdem das Reagens in allen Fällen der bei der Reaktion umgewandelten Menge gegenüber in sehr großem Überschusse vorhanden war) bei dem Peroxydasenversuche Proportionalität zwischen der Konzentration der Leukobase und dem Kurvenmaximum:

Konzentration der Leukobase	1 : 0,5 : 0,2
Kurvenmaximum	0,774 : 0,384 : 0,174 = 1 : 0,49 : 0,22

Das umgekehrte Verhältnis gilt für die Wasserstoffsuperoxyd-Konzentration: Während dieselbe beim Hämatin den Reaktionsverlauf dermaßen beherrschte, daß annähernde Proportionalität zwischen H_2O_2-Konzentration und Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden konnte, sahen wir hier allerdings die Steilheit des Kurvenanstieges mit der H_2O_2-Konzentration wachsen; der schließlich erreichte Endzustand ist aber nicht allzusehr verschieden:

Fig. 6.



Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds	1 : 0,5 : 0,2
Kurvenmaximum	0,774 : 0,658 : 0,604 = 1 : 0,85 : 0,79

Wir gelangen sonach zu dem Schlußergebnisse, daß das peroxydasenähnliche Verhalten des Hämatins und die Wirkung der echten tierischen Peroxydase als grundsätzlich differente Erscheinungskomplexe zu deuten sind, die voneinander auf das schärfste unterschieden werden können und unterschieden werden müssen.

Nur ein eingehenderes Studium dieser Erscheinungen von physikalisch-chemischen Gesichtspunkten aus kann einen tieferen

Einblick in die Reaktionskinetik der hier obwaltenden Vorgänge gewähren. Ein solches lag außerhalb unseres vorwiegend physiologischen Zielen zustrebenden Arbeitsplanes und wir glauben uns mit dem hier Mitgeteilten um so eher begnügen zu dürfen, als eingehendere Untersuchungen auf diesem Gebiete der physikalischen Chemie bereits gegenwärtig von fachmännischer Seite aus im Wiener physiologischen Institute in Angriff genommen worden sind.

Nur eines möchten wir hinzufügen, daß wir weder mit Liebermann[1]) noch mit Pighini[2]) hinsichtlich ihrer Auffassung der Rolle des Blutfarbstoffes bei der Guajakreaktion übereinstimmen. Wenn Liebermann der Meinung ist, die Umwandlung von Hämoglobin in Methämoglobin sei für die Reaktion von ausschlaggebender Wichtigkeit, so scheint uns das mit der Tatsache, daß auch das Hämatin als solches nach Abtrennung desselben aus seiner Verbindung mit der Globinkomponente die Reaktion gibt, schwer vereinbar. Die Auffassung von Pighini dagegen, der die Reaktion überhaupt nicht dem Blutfarbstoffe als solchem, sondern beigemengtem, durch hydrolytische Spaltung entstandenem kolloidalem Eisenhydroxyd zuschreibt, wird durch die Tatsache widerlegt, daß die katalytische Umwandlung von Leukomalachitgrün in Malachitgrün durch Hämatin auch in einer Lösung, die 10 Proz. freier Essigsäure, also doch sicherlich kein Eisenhydroxyd, enthält, mit großer Intensität vor sich geht. Die Möglichkeit dagegen, daß irgend ein anderer Dissoziationsvorgang der Reaktion zugrunde liegt, soll nicht bestritten werden.

6. Zur Frage der Beziehungen der Peroxydasen zu den Katalasen und glykolytischen Fermenten.

1. Katalasen. Die Frage, ob die Katalasen als oxydative Fermente aufzufassen seien, ist wiederholt erörtert worden und erst jüngst hat Lesser[3]) Zweifel an der Verschiedenheit von Oxydasen und Katalasen geäußert. Von besonderem Interesse schien uns aber eine aus jüngster Zeit stammende Angabe von W. Ewald[4]), der eine Verzögerung der Reduktion des in defibriniertem Blute vorhandenen Oxyhämoglobins durch Schwefelammonium bei Cyankaliumzusatz, sowie beim Erwärmen auf 60° beobachtet hat, dieselbe auf eine Aufhebung der Wirkung der Blutkatalase

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.
[4]) l. c.

(Hämase) bezieht und daraus weitgehende Schlüsse auf die Rolle der Katalasen bei den physiologischen Oxydationsvorgängen zieht.

Wir haben uns infolgedessen veranlaßt gesehen, die Frage, ob den Katalasen ein direkter nachweisbarer Einfluß auf oxydative Vorgänge zukommt, einer Prüfung zu unterziehen.

I. Aus Rindsleber wurde nach dem Vorgange von Batelli und Stern[1]) eine Katalaselösung bereitet. Proben wurden mit je 10 ccm einer entsprechend verdünnten Blutlösung, 3 ccm einer verdünnten Lösung von Ammoniumsulfid und 5 ccm entweder nativer, oder aber gekochter Katalaselösung in spektroskopischen planparallelen Trögen angesetzt und die Zeit beobachtet, welche vom Momente des Schwefelammonzusatzes bis zum Verschwinden der Oxyhämoglobinstreifen verflossen war.

Gekochte Katalaselösung:

a) 4 Minuten
b) 4 „ 10 Sekunden } Mittel $4\frac{1}{2}$ Minuten;
c) 5 „ 20 „

native Katalaselösung:

a) 5 Minuten 40 Sekunden } Mittel 5 Minuten 25 Sekunden.
b) 5 „ 10 „

Die Reduktion des Oxyhämoglobins durch Ammoniumsulfid war also durch die Katalase nicht beschleunigt worden.

II. Aus Pferdeblut wurde ein katalasehaltiges Präparat nach dem Vorgange von Senter[2]) hergestellt: 200 ccm defibrinierten Pferdeblutes wurden mit 2 Liter mit Kohlensäure gesättigten Wassers geschüttelt, 2 Liter Alkohol 95 Proz. hinzugefügt, der Niederschlag abfiltriert, abgepreßt, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet und das Pulver mit verdünnter Sodalösung geschüttelt. Das Filtrat zersetzte Wasserstoffsuperoxyd mit sehr großer Lebhaftigkeit.

Eine Reihe von Proben wurde aus je 10 ccm Blutlösung (1 Teil Blut : 60 Teilen Wasser), 1 ccm nativer oder gekochter Katalaselösung und 1 ccm Ammonsulfid in planparallelen Trögen angesetzt und die zum Verschwinden der Oxyhämoglobinstreifen erforderliche Zeit gemessen.

Katalase gekocht: a) 2, b) $2\frac{1}{2}$, c) 2, d) 2, e) $2\frac{1}{4}$ Minuten,
„ nativ a) 3, b) $3\frac{1}{2}$, c) 2, d) 2, e) 2 „

Das Resultat war also auch hier ein negatives.

III. Einige Proben wurden mit je 2 ccm farbloser Phenolphthalinlösung, 1 ccm einer stark verdünnten Acethäminlösung, 2 ccm $\frac{1}{10}$ n-NaOH, 1 ccm H_2O_2 0,27 Proz. und 100 ccm Wasser und überdies 1 ccm nativer oder gekochter Blutkatalaselösung (vom vorigen Versuche) versetzt. Die oxydative Bildung von Phenolphthaleïn in den Proben wurde durch spektrophotometrische Ablesung im Bereiche des abgegrenzten Absorptionsstreifens verfolgt:

---

[1]) F. Battelli und L. Stern, Compt. rend. Soc. de Biol. 57, 374 (1904).
[2]) Senter, Zeitschr. f. physikal. Chem. 44, 274.

	Native Katalase Grad	Gekochte Katalase Grad	
Teilkreisablesung in der 5. bis 8. Minute . .	79,6	78,2	77,4
" " " 9. " 10. " . .	72,7	74,3	72,2
" " " 13. " 14. " . .	72,4	72,8	71,4, 72,4

Die Farbstoffbildung in den Proben mit nativer und gekochter Katalase geht also genau parallel.

Sehr kräftig wirksame Katalasepräparate hatten sich also als unfähig erwiesen, die Oxydation von Ammoniumsulfid durch Oxyhämoglobin, sowie diejenige von Phenolphthalin durch Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Hämatin merklich zu beschleunigen.

Für die Annahme einer direkt oxydierenden Wirkung der Katalasen hat sich sonach kein Anhaltspunkt ergeben.

2. Glykolytische Fermente. Die postmortale Zuckerabnahme im Blute, welche nach den Untersuchungen von Lépine und Barral, sowie von Arthus auch bei Abwesenheit von Mikroorganismen vor sich geht, wird in der Regel auf die Wirkung eines glykolytischen Enzyms bezogen und dieses vielfach den oxydativen Fermenten zugerechnet. Insbesondere hat Spitzer[1]) im Laboratorium Röhmanns den Nachweis geführt, daß aus den Leukocyten des Pferdeblutes glykolytisch wirksame Extrakte gewonnen werden können und daß diese Zuckerzerstörung als ein Oxydationsvorgang aufzufassen sei.

Weiter stellte N. Sieber[2]) aus Fibrin, sowie aus Milz durch Extraktion mit Wasser, Neutralsalzlösungen, sowie mit verdünntem Alkohol eine Reihe von Auszügen her, welche einerseits Guajaktinktur teils direkt, teils erst bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd bläuten, andererseits aber glykolytisch wirksam waren. Die Glykolyseversuche wurden teils aseptisch, teils unter Anwendung schwächerer Antiseptica (Chloroform, Thymol) ausgeführt, da das Ferment die Anwendung stärkerer Antiseptica nicht vertrug. Doch ist die Autorin überzeugt, daß es sich nicht um Bakterienwirkung gehandelt habe und legt in dieser Hinsicht auf den Befund bak-

[1]) W. Spitzer, Die zuckerzerstörende Kraft des Blutes und der Gewebe. Berl. klin. Wochenschr. 1894, S. 949.

[2]) N. Sieber, Einwirkung der Oxydationsenzyme auf Kohlehydrate. Zeitschr. f. physiol. Chem. 39, 484 (1903); ferner: Zur Frage nach dem glykolytischen Prinzip des Blutfibrins. Ebenda 44, 500 (1905).

terienfeindlicher Stoffe im Fibrin besonderen Wert. Trotzdem sie gelegentlich durch Lösen und Fällen gereinigte (offenbar aus Leukocyten stammende) Guajakoxydasen in der Hand hatte, welche nicht mehr glykolytisch wirksam waren, läßt sie die Frage offen, ob und inwieweit die Glykolyse mit den oxydativen Enzymen in Zusammenhang stehe.

In Anbetracht der großen physiologischen Wichtigkeit des Glykolyseproblems haben wir uns veranlaßt gesehen, die Frage, ob die Eiterperoxydase eine zuckerzerstörende Wirkung auszuüben vermöge, experimentell zu prüfen.

1. 50 ccm einer Traubenzuckerlösung (0,94 Proz.) wurden mit 50 ccm einer Fluornatriumlösung (4 Proz.) und 10 ccm (einer aus blutfreiem Eiter durch Extraktion mit 2 proz. Fluornatriumlösung erhaltenen) Peroxydase versetzt. Die zugesetzte Zuckermenge betrug demnach 0,47 g. Nach eintägigem Verweilen der Probe im Brutofen wurde der Zuckergehalt nach Fehling titrimetrisch bestimmt. Es fanden sich 0,50 g.

2. Wiederholung des Versuches unter Zusatz von 1 bzw. 20 ccm H_2O_2 (3 proz.). Titration nach 24 Stunden bei 40°: 0,49 bzw. 0,48 g Zucker. Die dem Brutofen entnommenen Proben gaben noch sehr kräftige Peroxydasenreaktion mit Jodkalium.

3. Wiederholung des Versuches mit Eiter, der einem Hunde aus einem nach Terpentinölinjektion entstandenen Abszesse frisch entnommen worden war:

a) ohne Wasserstoffsuperoxydzusatz; Titration[1]) nach 15 Std. bei 40°: 0,53 g Zucker;

b) unter Zusatz von 5 ccm H_2O_2 1,5 Proz.; Titration[1]) nach 15 Std. bei 40°: 0,52 g Zucker.

4. 50 ccm 1 proz. Zuckerlösung wurde mit 10 ccm frischen Eiters (Terpentinölinjektion) ohne Zusatz irgend eines Antiseptikums 30 Stunden im Brutofen belassen. Titration: 0,48 g Zucker.

5. Wiederholung des vorigen Versuches unter Zusatz einiger Thymolkristalle bzw. einiger Tropfen Toluol. Titration: 0,51 bzw. 0,50 g Zucker.

6. 50 ccm Zuckerlösung 1 Proz. wurden mit 10 ccm frischen Eiters, 10 ccm H_2O_2 0,3 Proz. und 10 ccm Hämatinlösung 1:5000, jedoch ohne irgend einen desinfizierenden Zusatz, gemengt. Titration nach 18 Stunden im Brutofen: 0,52 g Zucker.

7. Wiederholung des vorigen Versuches unter Zusatz von Thymolkristallen bzw. Toluolwasser: 0,52 bzw. 0,49 g Zucker.

Trotzdem die Proben auch nach eintägigem Verweilen im Brutschranke noch reichlich Peroxydase enthielten, war es in keinem Falle gelungen, gleichgültig, ob mit oder ohne Zusatz von Antisepticis, Wasserstoffsuperoxyd und

[1]) Die Probe wurde vor der Titration durch Aufkochen nach Zusatz weniger Tropfen Essigsäure enteiweißt.

Hämatin gearbeitet wurde, auch nur die geringste Glykolyse zu erzielen.

Wir halten es daher für bewiesen, daß die glykolytischen Enzyme des Blutes nicht mit den echten Peroxydasen der Leukocyten identisch sind.

Zusammenfassung.

1. Die bisher zum Nachweis der tierischen Peroxydasen fast ausschließlich benutzte Guajakreaktion ist wegen der praktischen Schwierigkeit bzw. Unmöglichkeit, Gewebe vom Blutfarbstoff vollständig zu befreien, für diesen Zweck, soweit es sich um die Organe von Tieren handelt, die in ihrem Blute Hämoglobin führen, ganz ungeeignet und die diesen Gegenstand betreffenden Angaben früherer Autoren beruhen vielfach auf einer Verwechslung der echten Peroxydasen mit der peroxydasenähnlichen Wirkung des Blutfarbstoffes.

2. Bei Verwendung der Guajakreaktion zum Zwecke des Fermentnachweises in hämoglobinfreien Geweben oder Gewebsflüssigkeiten empfiehlt es sich, um einer Trübung des Resultates durch unkontrollierbare Nebenumstände vorzubeugen, das Terpentinöl durch Wasserstoffsuperoxyd (nach Carlson), das Guajakharz durch eine Lösung reiner Guajakonsäure zu ersetzen.

3. Der Nachweis von Peroxydasen in bluthaltigen Geweben und Säften wird durch die Jodreaktion (Jodabspaltung aus angesäuerter Jodkaliumlösung bei Gegenwart von Wasserstoffsuperoxyd) ermöglicht, da die Oxydation der Jodwasserstoffsäure (zum Unterschied von der Oxydation der Guajakonsäure und anderen cyklischen Chromogenen) durch den Blutfarbstoff nicht katalytisch beschleunigt wird. Doch besitzt nur der positive, nicht aber der negative Ausfall der Reaktion Beweiskraft (Reaktionshemmung durch Eiweißkörper und andere jodbindende Gewebsbestandteile).

4. Es gelang so, die Gegenwart echter Peroxydasen (im Sinne von Bach und Chodat) in Leukocyten (Eiterzellen), in lymphoiden Geweben (Knochenmark, Milz, Lymphdrüsen) und im Sperma mit Sicherheit nachzuweisen; die Enzyme sind in den zelligen Elementen, nicht aber in der sie umgebenden Flüssigkeit enthalten und können denselben durch Salzlösungen teilweise entzogen werden.

5. Eiterzellen geben mit frisch bereiteter Guajakonsäure bei Abwesenheit von Peroxyden keine Reaktion, enthalten also keine „direkte Oxydase“ im Sinne der älteren Autoren.

6. Um die Wirkung tierischer Oxydasen messend verfolgen zu können, wurde ein spektrophotometrisches Verfahren ausgearbeitet, welches auf der oxydativen Bildung von Malachitgrün aus seiner Leukobase beruht.

7. Verzeichnet man die mit Hilfe dieser Methoden gewonnenen Ergebnisse graphisch, indem man die Zeitwerte als Abszissen, die zugehörigen Mengen des Oxydationsproduktes als Ordinaten aufträgt, so werden die durch das Hämatin katalysierten Reaktionen annähernd durch gerade Linien veranschaulicht, welche unter verschiedenen Winkeln vom Koordinatenanfangspunkte ausgehen. Der Reaktion echter tierischer Peroxydasen (aus Eiterzellen) entsprechen dagegen Kurven, die nach einem stetigen mehr oder minder steilen Anstiege plötzlich abbiegen, um schließlich der Abszissenachse parallel zu verlaufen.

8. Die Hämatinreaktion wird durch Variation der Konzentration des katalysierenden Farbstoffes und des Superoxyds in hohem Grade, durch eine solche des Angriffsobjektes (Leukobase) nur wenig beeinflußt. Die Peroxydasenreaktion dagegen ist von einer Konzentrationsveränderung des Angriffsobjektes zum mindesten hinsichtlich des Endzustandes viel abhängiger als von einer solchen des Superoxyds.

9. Die Annahme, daß die oxydierende Wirkung des Blutfarbstoffes auf der hydrolytischen Abspaltung von kolloidalem Eisenhydroxyd beruhe (Pighini), wird durch die Tatsache widerlegt, daß die Oxydation der Leukobase auch bei stark saurer Reaktion durch Hämatin katalytisch beschleunigt wird.

10. Kräftig wirksame Katalase erwies sich unfähig, die Oxydation des Ammoniumsulfids durch Oxyhämoglobin, sowie diejenige des Phenolphthalins durch Wasserstoffsuperoxyd bei Gegenwart von Hämatin zu beschleunigen. Für die Annahme einer direkten oxydativen Wirksamkeit der Katalasen im Sinne von W. Ewald liegt sonach kein Anhaltspunkt vor.

11. Das glykolytische Blutferment ist keinesfalls mit der Peroxydase der weißen Blutzellen identisch.

Wien, Juli 1907.

XXIV.

Über Aktivierung und Reaktivierung des Pankreassteapsins.

Ein Beitrag zur Frage der komplexen Natur der Fermente.

Von cand. med. **Hedwig Donath.**

Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Prof. Dr. Otto v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.

1.

Bereits von vielen Seiten ist darauf hingewiesen worden, daß die Fermente in ihrem Verhalten mancherlei Analogien zu den Toxinen zeigen, und man hat wiederholt die Vermutung ausgesprochen, daß sich diese Übereinstimmung vielleicht auch auf eine komplexe Natur derselben erstrecke, insofern die Enzyme, ebenso wie die Toxine, aus zwei Komponenten, einem thermostabilen „Ambozeptor“ und einem thermolabilen „Komplement“ zusammengesetzt sein könnten (vgl. Oppenheimer[1]).

Zahlreiche über die Existenz von Zymogenen, die Bildung von Antifermenten, sowie über die Bindung zwischen Ferment und Substrat vorliegende Angaben können im Sinne einer solchen Hypothese verwertet werden, ohne jedoch eine anderweitige Deutung auszuschließen.

Nun sind aber im Laufe der letzten Jahre eine Anzahl einschlägiger Beobachtungen gemacht worden, durch welche die erwähnte Hypothese erhöhtes Interesse und eine festere Grundlage gewonnen hat.

Hierher gehört zunächst die Erkenntnis, daß das an sich unwirksame Trypsinogen des Pankreassaftes durch eine thermolabile „Kinase“ (Enterokinase) aktiviert wird.

---

[1]) L. Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, II. Aufl., S. 64 bis 66, 78.

Walker[1]) ist für das Ptyalin und Lab zu der Annahme gelangt, daß diese Fermente komplexer Natur sind und sich aus einem thermostabilen „Ambozeptor“ und thermolabilen „Komplemente“ zusammensetzen. Durch Erhitzen auf 50 bis 55° wird inaktiviertes Ptyalin durch Zusatz von Blut oder Organextrakt reaktiviert; auf 50° erhitztes Blut ist unwirksam.

Nach Harden und Young[2]) können Hefeenzym und Coferment durch Filtration mit Hilfe eines Gelatinefilters voneinander getrennt werden. Das Coferment ist thermostabil, dialysabel, mit Alkohol fällbar und würde also dem Ambozeptor entsprechen. Die alkoholische Gärung in Dextrose durch Hefesaft wird bedeutend gesteigert (verdoppelt), wenn man gekochten und filtrierten Hefesaft hinzufügt.

Bearn und Cramer[3]) erhitzten Pepsin, Lab, Takadiastase und Emulsin auf 56 bis 60°. Solche „Zymoide“ hemmen die Fermentwirkung, doch verhalten sich verschiedene Präparate inkonstant. Erhitzen auf 100° zerstört meist den Hemmungskörper. Beim Lab wurde bisweilen beobachtet, daß es einen Unterschied macht, ob man die Milch zuerst mit dem Zymoid und dann mit dem Labferment versetzt, oder umgekehrt. Daraus schlossen die Autoren, daß das inaktivierte Enzym sich direkt zur Milch in Beziehung setzt, also kein „Antiferment“ sei. Sie erörtern die Frage, ob die Zymoide von vornherein den Fermenten beigemengt seien, also etwa in dem Sinne, wie es O. Schwarz[4]) für das Antipepsin annimmt, und nur durch die aktiven Fermente verdeckt würden, oder ob sich die Fermente als solche beim Erhitzen in Zymoide umwandeln.

Da nun gewisse, die Aktivierung von Steapsin durch Galle bzw. cholsaure Salze betreffende Beobachtungen[5]) die Annahme einer komplexen Natur dieser Enzyme nahezulegen schienen, hat mich Herr Prof. v. Fürth veranlaßt, das fettspaltende Ferment der Pankreaslipase von diesem Gesichtspunkte aus genauer zu untersuchen. Da die Lipase in höherem Grade als die Mehrzahl

---

[1]) E. W. Ainley Walker, The composition of certain normal ferments, considered in relation to the constitution of lysins. Proc. Physiol. Soc. Dec. 16, 1905; Journ. of Physiol. 33, XXI.

[2]) Harden und Joung, The alcoholic ferment of yeast juice. Journ. of Phys. 32; Proc. Phys. Soc. Nov. 12, 1904.

[3]) Bearn und Cramer, On Zymoids. Biochem. Journ. 2, 474.

[4]) O. Schwarz, Zur Kenntnis der Antipepsine; aus dem physiol.-chem. Inst. in Straßburg. Diese Beiträge 6, 524.

[5]) O. v. Fürth und J. Schütz, Über den Einfluß der Galle auf die fett- und eiweißspaltenden Fermente des Pankreas. Diese Beiträge 9, 28 (1906).

der bisher untersuchten Fermente die Möglichkeit bietet, den Ablauf einer Fermentreaktion mit Hilfe ebenso einfacher wie genauer Methoden zu verfolgen, mußte sie als ein geeignetes Material für Studien auf diesem für die allgemeine Auffassung der Fermentreaktionen wichtigen Gebiete erscheinen.

Meine einschlägigen Versuche erstrecken sich, wie ich vorausschickend bemerken möchte, namentlich auf folgende Fragen:

1. Welcher Gesetzmäßigkeit unterliegt die Aktivierung des Pankreassteapsins durch steigende Cholsäuremengen?

2. Läßt sich auch ein Ablauf der Lipasenreaktion im umgekehrten Sinne, also in der Richtung einer Synthese des Fettes aus seinen Komponenten, durch Cholsäure oder andere katalysierend wirksame Agenzien beschleunigen?

3. Welche Beziehungen bestehen zwischen der Wirkungsstärke und Aktivierbarkeit einer Steapsinlösung?

4. Ist jede Lipase, auch eine solche pflanzlichen Ursprungs, durch Cholsäure aktivierbar, oder ist dies eine spezifische Eigenschaft des Pankreassteapsins?

5. Existiert eine der Enterokinasewirkung auf das Trypsinogen analoge Aktivierung des Steapsins durch Organextrakte?

6. Ist eine durch erhöhte Temperatur unwirksam gemachte Lipase durch Blutserum reaktivierbar?

7. Übt eine durch Wärme inaktivierte Lipase eine fördernde oder hemmende Wirkung auf das native Ferment aus?

Hinsichtlich der angewandten Untersuchungsmethoden sei folgendes bemerkt:

Als brauchbare Steapsinpräparate erwiesen sich Glycerinextrakte (6 : 250 oder 12 : 250) aus dem von der chemischen Fabrik „Rhenania“ in Aachen hergestellten „Pankreatin. absolutum“. — Gelegentlich arbeitete ich auch mit Pankreaspreßsäften, die durch Extraktion frischer, zerkleinerter Drüsen (vom Rinde) mit physiologischer Kochsalzlösung und Kolieren durch Leinwand gewonnen worden waren. — Als Angriffsobjekt wurden nach den Angaben von Kanitz[1]) hergestellte Fettemulsionen benutzt, indem käufliches Olivenöl mit jener (titrimetrisch festgestellten) Menge $^1/_{10}$ n-Natronlauge versetzt wurde, die eben erforderlich war, um alle in dem Öle enthaltenen Fettsäuren zu neutralisieren. Beim Umschütteln erhält man so eine sehr fein verteilte, dauerhafte und neutrale Emulsion.

Die Versuchsanordnung war in der Regel folgende: Je 20 ccm der Emulsion wurden mit der Pipette abgemessen und in ein Erlenmeyerkölbchen übertragen. Dann wurde eine abgemessene Menge der Steapsinlösung (um

---

[1]) Kanitz, Über Pankreassteapsin und über die Reaktionsgeschwindigkeit der mittels Enzyme bewirkten Fettspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 482 (1905).

die Viskosität der Glycerinlösung zu vermindern, wurde dieselbe mit etwas Wasser, und zwar 1 Teil Wasser zu 3 Teilen Glycerinextrakt, verdünnt) und der zu prüfenden Flüssigkeit (inaktivierte Lipase, Serum u. dgl.) sowie, um die Fäulnis zu verhindern, ein wenig Toluol zugesetzt, das Ganze gut durchgeschüttelt und auf eine bestimmte Zeit in den Brutofen gestellt. Die Titration erfolgte mit $^1/_{10}$ n-Natronlauge unter Anwendung von Phenolphtaleïn als Indikator. Zur Umgehung der Hydrolyse und der durch diese bedingten Titrationsfehler wurden, Kanitz' [1]) Angaben entsprechend, vor der Titration 50 ccm 95 proz. Alkohol hinzugefügt.

2.

A. Steapsinaktivierung durch steigende Cholsäuremengen.

Eine Anzahl von Serienversuchen wurden in der Weise ausgeführt, daß eine Reihe von Proben unter Einhaltung einer gleichen Konzentration von Fett und Steapsin mit steigenden Mengen einer Lösung von cholsaurem Natron versetzt wurde. Nach einer gewissen Zeit des Verweilens im Brutofen wurde die Menge abgespaltener Fettsäuren titrimetrisch festgestellt.

Versuch 1: 6 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Glycerinextrakt enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)	f)
Chols. Na 1 Proz.	0	1	2	3	4	5
Wasser	5	4	3	2	1	0
Titration nach 5 Std. . .	4,8	15,4	51,3	63,4	85,0	90,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

Versuch 2: 7 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 3 ccm Glycerinextrakt enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
Chols. Na 1 Proz.	0	0,5	2	4	8	12	20
Wasser	20	19,5	18	16	12	8	0
Titration nach 5 Std.	2,1	3,0	6,0	27,9	61,9	62,6	63,0

Versuch 3: 8 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 2 ccm Glycerinextrakt enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)
Chols. Na 1 Proz.	0	1	2	4	8	12	20	30
Wasser	30	29	28	26	22	18	10	0
Titration nach 6 Std. . . .	2,1	2,8	4,1	6,6	28,6	40,8	35,9	28,1

Versuch 4: 8 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 3 ccm Glycerinextrakt enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)
Chols. Na 1 Proz.	0	1	2	4	8	12	20	30
Wasser	30	29	28	26	22	18	10	0
Titration nach 6 Std. . . .	2,3	2,6	2,6	4,3	6,0	11,2	12,9	21,9

[1]) Kanitz, Beiträge zur Titration hochmolekularer Fettsäuren. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 6, 400 (1906).

Versuch 5: 7 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 2 ccm Glycerinextrakt enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)
Chols. Na 1 Proz.	0	5	10	15	20	25	30
Wasser	30	25	20	15	10	5	0
Titration nach 6 Std.	1,5	2,1	2,8	4,2	4,0	12,2	17,9

Versuch 6: 5 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Pankreaspreßsaft enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)
Chols. Na 1 Proz.	0	5	10	15	20
Wasser	20	15	10	5	0
Titration nach 8 Std.	65,5	111	151	152	151,5

Versuch 7: 5 Kölbchen, je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Pankreaspreßsaft enthaltend.

Ferner:	a)	b)	c)	d)	e)
Chols. Na 1 Proz.	0	5	10	15	20
Wasser	20	15	10	5	0
Titration nach 8 Std.	15,7	33,4	49,0	77,2	84

Nebenstehende Figur enthält die graphische Registrierung der mitgeteilten Versuche.

Ein Blick auf dieselbe lehrt folgendes:

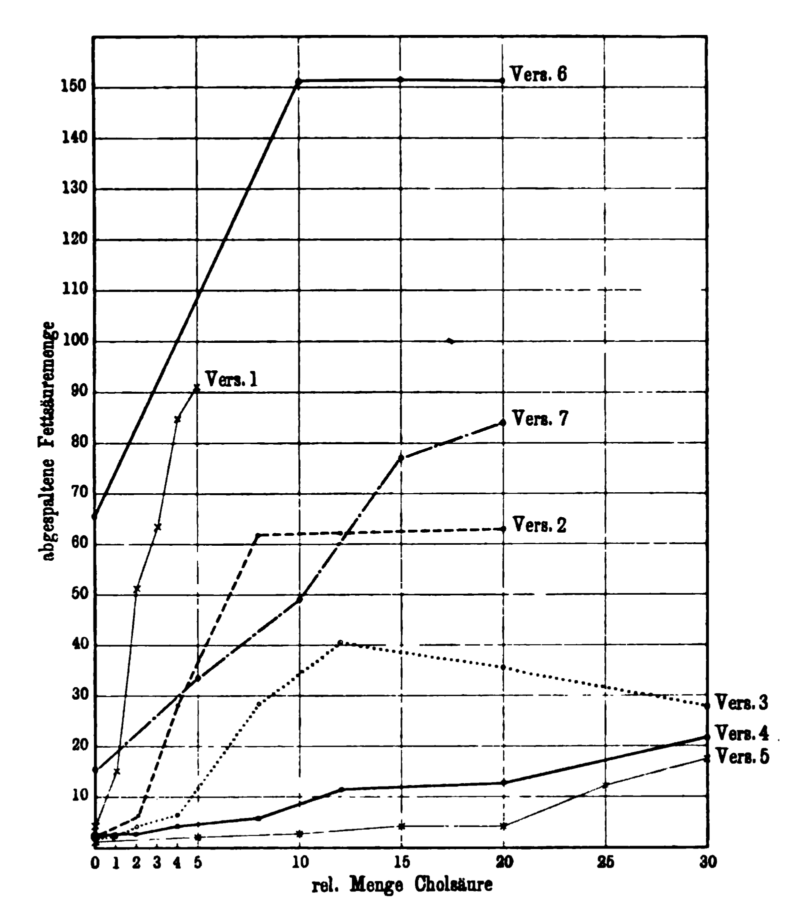
Die Aktivierbarkeit verschiedener Steapsinpräparate erscheint sehr verschieden. Während z. B. die ohne Zusatz nur schwache Fermentwirkung im Versuch 1 durch Cholsäure nahezu verzwanzigfacht, in Versuch 2 verdreißigfacht wurde, erwies sich der an sich außerordentlich kräftige Pankreaspreßsaft des Versuchs 6 nur relativ schwach aktivierbar, insofern selbst große Cholsäuremengen die Wirkung nur zu verdoppeln vermochten. Ich werde im nächsten Abschnitte Gelegenheit nehmen, auf diese Verhältnisse zurückzugreifen.

Die Betrachtung des Kurvenverlaufs ergibt nun, daß zunächst die Aktivierung der Steigerung der Cholsäuremenge in erster Annäherung ungefähr parallel geht, bis ein gewisses Niveau erreicht ist. Dann erfährt die Kurve eine Knickung (Versuch 2 und 6), um weiterhin der Abszisse parallel zu verlaufen. Man gewinnt den Eindruck, als ob zunächst ein Zymogenvorrat durch das Aktivierungsmittel in wirksames Ferment umgewandelt würde. Ist der Zymogenvorrat aber einmal erschöpft, so kann ein weiterer Zusatz des Aktivators keinen Effekt mehr hervorrufen.

B. Versuche zur Aktivierung der fermentativen Fettsynthese.

Ein besonderes Interesse bietet der oben mitgeteilte Versuch 3, wo die Kurve, von einem bestimmten Punkte angefangen, anstatt

zu steigen, absinkt. Die nächstliegende Deutung dieser Erscheinung ist wohl die Annahme, daß in diesem Falle durch das relative Übermaß des angewandten Aktivators eine Umkehr des Reaktionsverlaufes stattgefunden habe.



Die Fähigkeit der Lipasen, eine Synthese von Fetten aus Glycerin und Fettsäuren zu bewirken, ist von Hanriot[1]) und Kastle und Loevenhart[2]) dargetan, von Mohr[3]) bestätigt und

---

[1]) Hanriot, Sur la reversibilité des actions diastasiques. Compt. rend. Soc. Biol. 70 und Compt. rend. 132.

[2]) J. H. Kastle und A. S. Loevenhart, Über Lipase, das fettspaltende Enzym und die Umkehrbarkeit seiner Wirkung. Amer. Chem. Journ. 24, 491.

[3]) O. Mohr, Über Lipase aus tierischen Organen und die Umkehrbarkeit ihrer fettspaltenden Tätigkeit. Wochenschr. f. Brauerei 19, 588.

neuerdings von Pottevin[1]) genau studiert worden. Wir legten uns daher die Frage vor, ob die Cholsäure nicht vielleicht in gleichem Maße befähigt sei, auf die fermentative Fettsynthese aus Glycerin und hohen Fettsäuren aktivierend einzuwirken, wie auf die Fettspaltung.

Ich stellte mir zu diesem Zwecke ein kräftig wirkendes Steapsinpräparat aus frischem Rinderpankreas durch wiederholte Behandlung mit Alkohol, Alkohol-Äther und Äther und Zerreiben des lufttrockenen Rückstandes her.

Versuch 8. Je 20 ccm reiner Ölsäure, 60 ccm Glycerin und 2 g des Fermentpulvers wurden in zwei Stöpselgläser gebracht. Zu dem einen wurden 5 ccm cholsaures Natron (1 proz.), zu dem anderen die gleiche Menge Wasser hinzugefügt. Zu Beginn des Versuches sowie weiterhin in gewissen Zeitabständen wurde eine Probe von je 5 ccm nach gründlichem Durchschütteln entnommen, und die Acidität davon nach Zusatz von 10 ccm Alkohol titrimetrisch bestimmt.

	Cholsäurehaltige Probe.	Kontrollprobe.
Frisch	Acidität = 32,8 ccm $^1/_{10}$ n-Säure	33,0 ccm $^1/_{10}$ n-Säure
Nach 2 Tagen . .	„ 31,3 „	30,0 „
„ 4 „ . .	„ 27,2, 27,2 „	24,5, 25,2 „
„ 6 „ . .	„ 19,7 „	17 „

Versuch 8a. Wiederholung des vorigen Versuches.

	Cholsäurehaltige Probe.	Kontrollprobe.
Frisch . . .	Acidität = 34,4, 34,1 ccm $^1/_{10}$ n-Säure	33,3, 33,1 ccm $^1/_{10}$ n-Säure
Nach 3 Tagen	„ 16,4, 15,8 „	15,6, 15,6 „
„ 5 „	„ 13,1, 13,3 „	12,1, 12,7 „
„ 12 „	„ 12,5, 12,0 „	11,5, 11,0 „

Es hatte also in den beiden Versuchen eine Fettsynthese in großem Umfange stattgefunden, wobei in dem einen Falle nahezu die Hälfte, im anderen zwei Drittel der vorhandenen Fettsäuremenge verbraucht worden waren. Dennoch war es nicht gelungen, eine außerhalb der Fehlergrenzen liegende Beschleunigung der synthetischen Fermentwirkung durch Cholsäurezusatz zu erzielen. Ich war daher nicht imstande, für die oben angegebene Erklärung des Versuches 3 einen eindeutigen Beweis zu erbringen.

Auch ein weiterer Versuch, die Fettsynthese durch Zusatz eines Mangansalzes zu beschleunigen, fiel negativ aus.

---

[1]) H. Pottevin, Actions diastasiques reversibles. Ann. Inst. Pasteur 22, 901 (1906).

Versuch 8b. Versuchsanordnung wie im vorigen Versuche, nur daß statt des Cholates 3 ccm einer Lösung von 0,05 g Maganeulfat in 3 ccm Wasser dem einen der beiden Ölsäure-Glyceringemische zugesetzt wurde.

	Manganhaltige Probe.	Kontrollprobe.
Frisch . . .	Acidität = 18,5, 18,6 ccm $^1/_{10}$ n-Säure	18,9, 18,8 ccm $^1/_{10}$ n-Säure
Nach 3 Tagen	„ 8,9, 8,9 „	8,9, 8,8 „

3.

A. Beziehungen zwischen Aktivität und Aktivierbarkeit der Lipase.

O. v. Fürth und Schütz[1]) hatten beobachtet, daß Steapsinlösungen, die durch Glycerinextraktion aus einem und demselben Pankreatinpräparate gewonnen worden waren, in ihrem Verhalten gegen dieselbe Cholatlösung insofern große Verschiedenheiten zeigten, als sich die einen nur wenig, die anderen in hohem Grade aktivierbar erwiesen. Es ergab sich ferner bei Versuchen mit fraktionierter Extraktion von Pankreatin mit Glycerin, daß die ersten beiden stark wirksamen Extrakte nur wenig aktivierbar waren, während das dritte, an sich viel schwächere Extrakt, durch Zusatz von Cholat in seiner Wirkung bedeutend gesteigert wurde.

Auch ich hatte Gelegenheit, ein Steapsinpräparat zu beobachten, dem gegenüber die Cholsäureaktivierung vollkommen versagte.

Versuch 9. 5 Kölbchen wurden mit je 20 ccm Milch und 5 ccm aktiven Pankreaspreßsaftes versetzt; ferner a) mit 20 ccm H_2O; b) 5 ccm chols. Na (1 proz.) und 15 ccm H_2O; c) 10 ccm chols. Na und 10 ccm H_2O; d) 15 ccm chols. Na und 5 ccm H_2O; e) 20 ccm chols. Na. Die Titration nach mehrstündigem Verweilen im Brutofen ergab für a) 34,5, b) 38,0, c) 37,5, d) 35,5, e) 36 ccm $^1/_{10}$ n-Säure.

Im Anschlusse an diese Versuche, welche den Gedanken an die Überführung eines Steapsinogens in ein Steapsin, also eines Profermentes in ein Ferment, nahelegten, stellte ich mir nun die Aufgabe, zu ermitteln, ob bei längerer Aufbewahrung einer Steapsinlösung eine spontane Zunahme ihrer direkten Wirksamkeit wahrnehmbar ist und ob mit dieser Zunahme eine Abnahme ihrer Aktivierbarkeit Hand in Hand geht.

Versuch 10. Kölbchen a) und b) mit je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm frischem Pankreaspreßsaft, c) überdies mit 2 ccm cholsaurem Natron 1 Proz. beschickt. a) sofort titriert, ergab eine Acidität von 21,5 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH, b) und c) nach 21 Stunden im Brutofen 66,8 bzw. 89,0 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH. — Die Aciditätszunahme 66,8 — 21,5 = 45,3 bot demnach ein Maß für die

[1]) l. c., S. 38.

direkte Wirksamkeit, die Differenz 89,0 — 66,8 = 22,2 ccm $^{1}/_{10}$ n-NaOH ein Maß für die Aktivierbarkeit der Lösung. Der Pankreaspreßsaft wurde acht Tage lang in der Kälte unter Toluolzusatz aufbewahrt und der Versuch sodann genau wiederholt. Nunmehr ergab sich für die direkte Wirksamkeit das Maß 61,3 ccm $^{1}/_{10}$ n-NaOH, also etwa um die Hälfte mehr als früher; eine Aktivierbarkeit des Pankreaspreßsaftes durch cholsaures Natron war in diesem Falle aber überhaupt nicht mehr nachweisbar.

Versuch 11. Analoge Anordnung. a) Sofort titriert 15,3 ccm $^{1}/_{10}$ n-NaOH, b) und c) nach 23 Stunden im Brutofen 60,5 bzw. 83,1 ccm $^{1}/_{10}$ n-NaOH. Daher 60,5 — 15,3 = 45,2 als Maß für die direkte Wirksamkeit, 83,1 — 60,5 = 22,6 ccm $^{1}/_{10}$ n-NaOH als Maß für die Aktivierbarkeit. Nach 7tägiger Aufbewahrung war die direkte Wirksamkeit auf 93,5 angestiegen, hatte sich sonach verdoppelt. Eine Aktivierbarkeit durch cholsaures Natron war nicht mehr vorhanden, im Gegenteil, an ihre Stelle war eine wirkliche Hemmungswirkung getreten.

Der Pankreaspreßsaft hatte demnach in beiden Versuchen, während seine direkte Wirksamkeit zugenommen hatte, seine Aktivierbarkeit durch cholsaures Natron eingebüßt.

Hält man dieses Resultat mit jenen oben erwähnten Beobachtungen zusammen (Versuch 2 und 6), wo die mit steigender Cholsäurekonzentration allmählich ansteigenden Aktivierungskurven an einem bestimmten Punkte jäh abknickten, um weiter horizontal zu verlaufen, so sieht man sich zu der Vorstellung hingedrängt, daß man es hier mit der Überführung eines unwirksamen Zymogens in ein wirksames Enzym zu tun hat, welche Umwandlung sich allmählich auch „spontan“ vollziehen, durch ein katalysierendes Agens aber (in diesem Falle also Galle oder ein gallensaures Salz) in hohem Grade beschleunigt werden kann[1]).

B. Aktivierungsversuche mit Extrakten der Darmschleimhaut.

Die Vermutung, daß das Pankreassteapsin nicht als solches sezerniert werde, sondern durch Umwandlung eines Zymogens entstehe, ist auf Grund physiologischer Beobachtungen wiederholt geäußert worden. So hat insbesondere Lintwarew[2]) sich dahin

[1]) Es sei hier an die interessanten Beobachtungen Connsteins und seiner Mitarbeiter über die Aktivierung der Ricinuslipase durch Säure usw. erinnert.

[2]) J. J. Lintwarew, Über den Einfluß der verschiedenen physiologischen Verhältnisse auf den Zustand und die Quantität der Fermente im Pankreassaft. In Dissert. St. Petersburg; Ref.: Jahresber. f. Tierchemie 32, 408 (1902).

ausgesprochen, daß zwar bei Fleischkost der Pankreassaft fertiges Steapsin enthalte, dieses jedoch bei kohlehydrat- und fettreicher Nahrung in Zymogenform ausgeschieden und durch Galle oder Darmsaft schnell in die wirksame Form übergeführt werde.

Es schien uns daher von physiologischer Wichtigkeit, festzustellen, ob die Darmschleimhaut, analog der trypsinaktivierenden Enterokinase, ein Agens enthalte, welches Steapsin zu aktivieren vermag.

Um dies festzustellen, wurde frischer Pankreaspreßsaft bereitet, ein Stück Dünndarm desselben Rindes aufgeschnitten, der Länge nach ausgebreitet und mit einem breiten, stumpfen Messer die Mucosa abgelöst, mit physiologischer Kochsalzlösung gründlich verrieben, so daß diese Mischung gut pipettierbar war; sodann wurde zu je 20 ccm Ölemulsion a) 5 ccm Pankreaspreßsaft, b) 5 ccm Darmschleimhautextrakt, c) 5 ccm Pankreaspreßsaft und 5 ccm Darmschleimhautextrakt zugesetzt.

Versuch 12.

a)		b)		c)	
Sofort	Nach 14 Std.	Sofort	Nach 14 Std.	Sofort	Nach 14 Std.
18,7	52,5	6,5	30,0	29,3	84
	— 18,7		— 6,5		— 29,3
	33,8		23,5		54,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 13.

a)		b)		c)	
Sofort	Nach 15 Std.	Sofort	Nach 15 Std.	Sofort	Nach 15 Std.
13,5	55	5,9	31	19,8	76,5
	— 13,5		— 5,9		— 19,8
	41,5		25,1		56,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Das Resultat war übereinstimmend derart, daß in c) die Spaltung nur um etwa so viel mehr betrug, als die lipolytische Wirkung der Darmschleimhaut an und für sich ausmachte, daß sich also a) und b) nahezu addierten und eine aktivierende Wirkung nicht vorhanden war, obgleich sich derselbe Pankreaspreßsaft, wie eine Parallelprobe ergab, durch Cholsäure stark aktivierbar erwies. Die Versuche ergaben sonach keinen Anhaltspunkt für die Annahme einer steapsinaktivierenden Kinase in der Darmschleimhaut.

C. Spezifizität des Aktivierungsvorganges.

Es schien uns nun weiter wesentlich festzustellen, ob die Aktivierung durch gallensaure Salze als eine spezifische Eigentümlichkeit des Pankreassteapsins gelten kann, oder aber für alle fettspaltenden Fermente charakteristisch ist.

Wir dehnten zu diesem Zwecke unsere Untersuchungen auf eine Lipase vegetabilischen Ursprungs aus.

Dank der Liebenswürdigkeit des Herrn Dr. W. Connstein gelangten wir in den Besitz einer nach seinem Verfahren [1]) dargestellten, äußerst wirksamen lipasehaltigen Emulsion aus Ricinussamen. Die Versuche wurden in folgender Weise angestellt: In zwei Stöpselgläser wurden je 50 ccm Ölemulsion, 20 ccm Wasser, 0,1 g Mangansulfat (als katalytisch wirkende Substanz), 5 ccm Ricinusferment gebracht; außerdem zu a) 5 ccm Wasser, b) 5 ccm Natriumcholatlösung (1 proz.) hinzugefügt. Die Gläser wurden gut durchgeschüttelt, je 5 ccm der Mischung mit der Pipette entnommen, mit 10 ccm Alkohol und einigen Tropfen Phenolphtaleïn versetzt und mit $^{1}/_{10}$ n-NaOH titriert, um die sofortige Acidität zu bestimmen. Dann wurden die beiden Gläser in den Brutofen gestellt, zu verschiedenen Zeiten nach energischem Durchschütteln Proben von je 5 ccm der Mischung mit der Pipette entnommen und titrimetrisch auf ihre Acidität geprüft. Es zeigte sich aber, daß sich trotz des Durchschüttelns schon beim Niederstellen des Gefäßes der Inhalt in eine obere dicke Schicht und eine untere wässerige Schicht trennte. Um daher etwaige Fehler zu vermeiden, die daraus entstehen konnten, daß beim Pipettieren bald mehr von der dicken Emulsion, bald mehr von der wässerigen Schicht abgehoben wird, wurde ein weiterer dritter Versuch in der Weise angestellt, daß 100 g Ölemulsion, 40 ccm Wasser, 0,2 g Mangansulfat, 10 ccm Ricinusferment in einem Gefäß gut durchgeschüttelt und dann auf sechs Kölbchen verteilt wurden, so daß in jedes Kölbchen 25 ccm der Mischung kamen. Drei davon wurden mit 5 ccm Wasser, drei mit 5 ccm cholsaurem Natron (1 proz.) versetzt; je ein Kölbchen nach tüchtigem Durchschütteln und nach Zusatz von 50 ccm Alkohol sofort, die anderen zwei nach mehrstündigem Verweilen im Brutofen titriert.

[1]) W. Connstein, E. Hoyer und H. Wartenberg, Über fermentative Fettspaltung. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 3988 (1902). — E. Hoyer, Fermentative Fettspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 414 (1907).

Versuch 14.

5 ccm Wasser		5 ccm chols. Na 1 Proz.	
Sofort	Nach 18 Std.	Sofort	Nach 18 Std.
2	41,7, 40,5	1,9	26,3, 28,5, 26,8

Versuch 15.

5 ccm Wasser			5 ccm chols. Na 1 Proz.		
Sofort	Nach 15 Std.	Nach 24 Std.	Sofort	Nach 15 Std.	Nach 24 Std.
5,2	28,5, 28,1	39,7, 41,5	6,5	25,5, 25,1	32,3, 31,5

Versuch 16.

Ohne chols. Na		Mit chols. Na 1 Proz.	
Sofort	Nach 18 Std.	Sofort	Nach 18 Std.
45,7	151,3, 154,3	49,7	100,3, 110,3

Alle Versuche zeigten übereinstimmend, daß die Cholsäure nicht nur nicht aktivierend, sondern sogar hemmend auf die Ricinuslipase einwirkt [1]).

Es sei hier auf den Befund von Laqueur [2]) und Boldyreff [3]) hingewiesen, demzufolge die Wirkung der Magen- bzw. Darmlipase durch Gallenzusatz kaum gesteigert wurde.

4. Reaktivierung des Steapsins durch Blutserum.

Nachdem sich aus den mitgeteilten Versuchen eine Reihe von Anhaltspunkten für die Annahme einer „komplexen“ Natur des Pankreassteapsins ergeben hatte, gingen wir an eine direktere Prüfung dieser Frage heran.

---

[1]) Aus einer mündlichen Mitteilung des Herrn Dr. Connstein entnehmen wir, daß dieses Resultat mit seinen Erfahrungen über Nichtaktivierbarkeit der Ricinuslipase durch Galle übereinstimmt. Vgl. auch eine darauf bezügliche Angabe von W. A. Bitny-Schlachto (Zur Lehre von der Lipase. Dissert. St. Petersburg 1904; Ref.: Jahresbeitr. f. Tierchem. 34, 980), der die Wirkung der Ricinuslipase durch Gallensäurezusatz nicht zu steigern vermochte.

[2]) E. Laqueur, Über das fettspaltende Ferment im Sekret des kleinen Magens. Diese Beiträge 8 (1906).

[3]) W. Boldyreff, Die Lipase des Darmsaftes und ihre Charakteristik. Zeitschr. f. physiol. Chem. 50, 394 (1907).

Es sollte festgestellt werden, ob durch vorsichtiges Erwärmen inaktiviertes Steapsin durch Zusatz von Blutserum reaktiviert werden könne, ob also hier Verhältnisse bestehen, ähnlich jenen, die man in der Immunitätslehre durch die Schlagworte „Ambozeptor“ und „Komplement“ schematisch zu bezeichnen pflegt.

Wie ich vorausschickend bemerken möchte, liegen in der Literatur bereits zwei Angaben vor, welche vielleicht in diesem Sinne verwertet werden könnten. In einer Arbeit von Beitzke und Neuberg [1]) findet sich nämlich eine mit zwei Versuchen belegte Angabe, derzufolge die Wirkung von Steapsin auf Ricinusöl durch Zusatz normalen Kaninchenserums gefördert wird. Allerdings wird weiterhin bemerkt, daß dieses Vermögen des Serums durch einstündiges Erhitzen auf 56° nicht aufgehoben wird.

Ferner beobachteten Achard und Clerc [2]), daß Blutserum, das sein lipolytisches Vermögen durch einstündiges Erhitzen auf 60 bis 62° eingebüßt hat, durch Zusatz frischen Serums reaktiviert wird.

Ich stellte zunächst durch einen Vorversuch die „Todestemperatur“ der Lipase fest.

Versuch 17. Eine Reihe von Kölbchen wurde mit je 20 ccm Ölemulsion, 2 ccm cholsauren Natrons 1 Proz. und mit 5 ccm nativen, bzw. 5 Minuten auf 50°, 55°, 60°, 65° und 70° erhitzten Glycerinextraktes aus Pankreatin „Rhenania“ beschickt, die Serie sodann auf 4 Stunden in den Brutofen gebracht und titriert.

Nativ		50°		55°	
Sofort	Nach 4 Std.	Nach 4 Std.		Nach 4 Std.	
3,5	21	24,3	23,3	20,7	21,2
	— 3,5	— 3,5	— 3,5	— 3,5	— 3,5
	17,5	20,8	19,8	17,2	17,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

60°		65°		70°		
Nach 4 Std.		Nach 4 Std.		Sofort	Nach 4 Std.	
8,5	9,6	4,2	4,3	3,2	3,5	3,6
— 3,5	— 3,5	— 3,5	— 3,5		— 3,2	— 3,2
5,0	6,1	0,7	0,8		0,3	0,4 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

[1]) Beitzke und Neuberg, Zur Kenntnis der Antifermente. Virchows Archiv 183, 177 (1906).

[2]) Achard und Clerc, Sur l'abolition du pouvoir lipasique du sérum par le chauffage et sa régeneration par l'addition du sérum frais. Compt. rend. Soc. Biol. 56, 812.

Wie aus diesem Versuche zu ersehen ist, erfolgt die Inaktivierung hier zwischen 55 und 65°.

Mit Rücksicht auf Angaben von Bearn und Cramer[1]) (für das Labferment), von Moritz und Glendinning[2]) (für die Diastase) und von O'Sullivan und Thomson[3]) (für das Invertin), denen zufolge Enzyme durch die Gegenwart ihres Angriffsobjektes (Milch, Stärkekleister, Rohrzucker) bis zu einem gewissen Grade gegen die zerstörende Wirkung der Wärme geschützt werden, habe ich weiterhin einen Versuch ausgeführt, bei dem Lipase einerseits mit, andererseits ohne Zusatz von Fettemulsion einer hohen Temperatur ausgesetzt wurde. Es sollte so festgestellt werden, ob etwa eine „Verankerung" des Ferments an das Angriffsobjekt dasselbe zerstörenden Einflüssen gegenüber widerstandsfähiger mache.

Versuch 18. Eine Reihe von Kölbchen wurde mit je 5 ccm eines stark wirksamen Pankreaspreßsaftes beschickt und eine halbe Stunde lang in einem Wasserbade bei einer Temperatur von 68° gehalten. 20 ccm Ölemulsion wurden teils vor, teils nach dem Erhitzen hinzugefügt und die Kölbchen sodann für 24 Stunden in den Brutofen gestellt.

	Bei Abwesenheit des Fettes inaktiviert			In Gegenwart des Fettes inaktiviert		
	Sofort titriert	Nach 24 Std.		Sofort titriert	Nach 24 Std.	
a)	16,9	43,5 — 16,9	38 — 16,9	23,5	31,0 — 23,5	23 — 23,5
		26,6	21,1		7,5	—
b)	15,9	33,5 — 15,9	27,5 — 15,9	21,5	33,5 — 21,5	33,5 — 21,5
		17,6	11,6		12,0	12,0

Von einer schützenden Wirkung des Angriffsobjektes auf das Ferment war hier sonach nichts zu bemerken.

Ich gehe nunmehr zur Beschreibung der Aktivierungsversuche als solcher über.

Wir gingen zunächst so vor, daß wir Glycerinextrakte aus Pankreatin „Rhenania" durch halbstündiges Erhitzen auf 60° bzw. 63°, 77° und 80° inaktivierten, sodann Kölbchen mit je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm der inaktivierten Fermentlösung beschickten,

[1]) l. c.
[2]) Moritz und Glendinning, Journ. chem. Soc. 1892, S. 689.
[3]) O'Sullivan und Thomson, ebenda 1890, S. 834.

entweder 5 ccm frischen Pferdeblutserums oder aber 5 ccm Wasser hinzufügten und die Proben sodann nach vier- bis fünfstündigem Verweilen im Brutofen titrierten.

Versuch 19. A. Ferment bei 60° inaktiviert.

a) Wasser			b) Blutserum		
Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen	
3,3	3,8	3,5	4,5	11,3	11,2
	— 3,3	— 3,3		— 4,5	— 4,5
	0,5	0,2		6,8	6,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
B. Ferment bei 63° inaktiviert.					
3,4	4,5	4,5	4,8	10,0	10,0
	— 3,4	— 3,4		— 4,8	— 4,8
	1,1	1,1		5,2	5,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
C. Ferment bei 77° inaktiviert.					
3,3	3,2	3,3	4,7	5,0	4,7
	— 3,3	— 3,3		— 4,7	— 4,7
	—	—		0,3	— ccm $^1/_{10}$ n-NaOH
D. Ferment bei 80° inaktiviert.					
3,3	3,7	3,7	4,6	5,3	4,9
	— 3,3	— 3,3		— 4,6	— 4,6
	0,4	0,4		0,7	0,3 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Als Maß der Wirksamkeit derselben Fermentlösung in aktivem Zustande bei gleicher Versuchsanordnung ergab sich 4,4 bzw. 4,7 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH. Die (an sich ziemlich schwach wirksame) Fermentlösung, die durch Erhitzen auf 60 bzw. 63° inaktiviert worden war, konnte also durch Pferdeblutserum reaktiviert werden; hinsichtlich der bei 77° bzw. 80° inaktivierten Fermentlösung war dies dagegen nicht der Fall.

Der nächste Versuch galt der Feststellung, ob die Reaktivierung durch einen thermolabilen oder thermostabilen Bestandteil des Blutserums erfolge.

Versuch 20. Pferdeblutserum wurde verdünnt, mit Essigsäure schwach angesäuert, auskoaguliert, filtriert und das neutralisierte Filtrat wieder auf das Volumen des nativen Serums gebracht.

Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm eines durch Erwärmen inaktivierten Glycerinextraktes aus Pankreatin „Rhenania“; dazu 5 ccm

a) Enteiweißtes Serum			b) Natives Serum		
Sofort	Nach 24 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 24 Std. im Brutofen	
3,2	5,4 — 3,2	5,2 — 3,2	4,0	31,5 — 4,0	32,1 — 4,0
	2,2	2,0		27,5	28,1 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Das enteiweißte Serum hatte sich also als ganz unwirksam, das native Serum als sehr kräftig, im Sinne einer Reaktivierung der Lipase wirksam erwiesen. Die Reaktivierung wird also durch ein thermolabiles Agens bewirkt.

Ein weiterer Versuch wurde zur Erzielung größerer Ausschläge unter Zusatz von cholsaurem Natron 1 Proz. ausgeführt.

Versuch 21. Pankreaspreßsaft wurde durch Erwärmen auf 65° inaktiviert, oder, richtiger gesagt, abgeschwächt.

Proben, je 20 ccm Ölemulsion, 5 ccm abgeschwächten Preßsaftes und 2 ccm cholsaures Natron (1 proz.) enthaltend, ferner:

a) 5 ccm Wasser			b) 5 ccm Pferdeblutserum		
Sofort	Nach 12 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 12 Std. im Brutofen	
22,5	36,0 — 22,5	36,9 — 22,5	18,9	48,2 — 18,9	48,9 — 18,9
	13,5	14,4		29,3	30,0 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Proben, 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm Pferdeserum enthaltend, ergaben bei sofortiger Titration eine Acidität von 3,0, nach 24 Stunden eine solche von 3,3 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH. Der beobachtete Effekt konnte also nicht etwa durch die lipolytische Kraft des Serums als solchem bedingt sein.

Es ergab sich weiterhin, daß die aktivierende Wirkung des Blutserums, ebensogut wie an durch Erwärmen inaktivierten Lipasepräparaten, unter Umständen auch an „spontan" (d. h. durch andere Einflüsse unbekannter Natur) abgeschwächten Fermentlösungen in eklatanter Weise demonstriert werden kann.

Versuch 22. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm eines sehr schwach wirksamen Glycerinextraktes aus Pankreatin, dazu:

a) 5 ccm Wasser			b) 5 ccm Pferdeserum	
Sofort	Nach 24 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 24 Std. im Brutofen
3,0	4,1 — 3,0	4,5 — 3,0	4,0	24,8 — 4,0
	1,1	1,5		20,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Kontrollprobe: 20 ccm Ölemulsion + 5 ccm Pferdeserum.

Sofort 3,0
Nach 24 Std. im Brutofen . . . 2,8 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH.

Also auch hier handelte es sich nicht etwa um eine lipolytische Wirksamkeit des Serums als solchen, sondern um eine Aktivierung des an sich fast unwirksamen Glycerinextraktes.

Es erübrigt jetzt nur mehr den Nachweis, ob das aktivierende Agens im Blutserum nach Art von „Komplementen" oder „Cytasen" bereits bei einer tief unter 100° gelegenen Temperatur geschädigt wird.

Versuch 23. Es wurde zu diesem Zwecke frisches Blutserum in zwei Portionen geteilt und die eine Hälfte eine halbe Stunde lang bis gegen 70° erhitzt. Je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm eines durch Erwärmen abgeschwächten Pankreaspreßsaftes wurden versetzt mit:

a) 5 ccm nativen Serums			b) 5 ccm erwärmten Serums		
Sofort	Nach 20 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 20 Std. im Brutofen	
16,8	36,5 — 16,8	37,0 — 16,8	18,0	32,5 — 18,0	33,0 — 18,0
	19,7	20,2		14,5	15,0

c) Ohne Zusatz	
Sofort	Nach 20 Std. im Brutofen
16,0	30,0 — 16,0
	14,0

Das Serum hatte also seine Wirksamkeit durch Erwärmen auf 70° eingebüßt.

Es geht sonach aus den mitgeteilten Versuchen hervor, daß die durch Erwärmen auf 60 bis 63° inaktivierte Pankreaslipase durch ein im normalen Pferdeblutserum enthaltenes thermolabiles Agens einen Teil ihrer Wirksamkeit wieder erlangen kann, während dies bei dem auf 77 bis 80° erwärmten Fermente nicht mehr der Fall ist.

Zu dieser Reaktivierung ist, wie aus der Versuchsanordnung ersichtlich, die Gegenwart der Ölemulsion beim Inaktivierungsvorgange, also eine „Verankerung des Fermentes an das Angriffsobjekt" und ein dadurch bedingter Schutz seiner bindenden Gruppe keineswegs erforderlich.

Ein Versuch, bei 62° (bzw. 70° und 90°) inaktivierte Ricinuslipase durch Zusatz von Blutserum zu reaktivieren, fiel negativ aus

5. Hemmung der Steapsinwirkung durch inaktiviertes Ferment.

Harden und Young[1]) beobachteten eine erhebliche Verstärkung der alkoholischen Gärung beim Zusatze gekochten Hefepreßsaftes. Bearn und Cramer[2]) dagegen sahen, daß bei 56 bis 60° inaktiviertes Pepsin und Lab die Wirkung der aktiven Fermente hemmt und bei Anwendung ausreichend großer Mengen sogar vollständig aufhebt. Während O. Schwarz[3]) analoge Beobachtungen im Sinne der Existenz eines dem genannten Fermente von vornherein beigemengten Antifermentes deutet, sind die beiden genannten Autoren geneigt, die Hemmung in dem Sinne zu erklären, daß das Erwärmen das Enzym zwar seiner Fähigkeit beraubt hat, sein Angriffsobjekt zu spalten, nicht aber der Fähigkeit, sich mit dem letzteren zu verbinden. Nun wäre aber das mit dem inaktivierten Enzym beladene Angriffsobjekt sozusagen wegen Platzmangels unfähig, aktives Ferment aufzunehmen und infolgedessen gegen die spaltende Wirkung des letzteren geschützt.

Jedoch nicht nur die Hemmungswirkung, sondern auch die von Harden und Young beobachtete Förderung der Fermentwirkung durch das abgetötete Enzym ist im Sinne der Lehre von der Komplexität der Fermente einer Erklärung zugänglich, insofern die schädigenden Agenzien die Komplemente vernichten, die Ambozeptoren aber intakt lassen, diese letzteren aber, mit einem Überschüß von Komplementen in Beziehung gebracht, sich mit diesen zu neuen aktiven Enzymen verbinden könnten.

Ohne auf die Diskussion von Theorien, deren Formulierung heute sicherlich zum mindesten noch verfrüht erscheinen müßte, eingehen zu wollen, schien es uns immerhin erwünscht, hinsichtlich der Lipase objektiv festzustellen, ob sie durch die Gegenwart inaktivierten Fermentes im Sinne einer Hemmung oder Förderung beeinflußt werde.

Es sei bei dieser Gelegenheit auch eine Beobachtung von Magnus[4]) erwähnt, der durch Dialyse unwirksam gewordenes, esterspaltendes Ferment der Leber durch Zusatz von gekochtem Lebersaft reaktiviert sah, eine Wirkung, welche Loevenhart[5]) den darin befindlichen gallensauren Salzen zuschreibt.

---

1) l. c.

2) l. c.

3) l. c.

4) R. Magnus, Zur Wirkungsweise der esterspaltenden Fermente der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 148 (1904).

5) A. S. Loevenhart, On the so-called coferment of lipase. Journ. of biol. Chemistry 2, 391 (1907).

Wir gingen bei den Versuchen derart vor, daß wir Proben, je 20 ccm Ölemulsion und 5 ccm eines aktiven Glycerinextraktes aus Pankreatin enthaltend, entweder mit 5 ccm eines ebensolchen, jedoch eine halbe Stunde bei 70 bis 100° inaktivierten Extraktes, oder aber zum Vergleiche mit der gleichen Menge Glycerin versetzten und nach längerem Verweilen im Brutschranke titrierten.

Versuch 24.

Vergleichsprobe	Inaktiviertes Extrakt (70°)
Nach 4 Std. im Brutofen	Nach 4 Std. im Brutofen
12,9 14,4 12,2	10,3 10,2 10,0 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 25.

Vergleichsprobe	Inaktiviertes Extrakt (70°)
Nach $4^1/_2$ Std. im Brutofen	Nach $4^1/_2$ Std. im Brutofen
10,6 10,3 10,3	9,3 9,2 9,2 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 26. Jede Probe mit 10 ccm chols. Natron 1 Proz. versetzt.

Vergleichsprobe				Inaktiviertes Extrakt (70°)		
Sofort	Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur	Nach 5 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 24 Std. bei Zimmertemperatur	Nach 5 Std. im Brutofen
2,4	31,8	48,6	41,6	4,0	24,1	34,6
	— 2,4	— 2,4	— 2,4		— 4,0	— 4,0
	29,4	46,2	39,2		20,1	30,6 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 27. Jede Probe mit 1 ccm chols. Natron 1 Proz. versetzt.

Vergleichsprobe			Inaktiviertes Extrakt (70°)		
Sofort	Nach $4^1/_2$ Std. im Brutofen		Sofort	Nach $4^1/_2$ Std. im Brutofen	
3,6	13,1	13,1	4,7	9,9	10,1
	— 3,6	— 3,6		— 4,7	— 4,7
	9,5	9,5		5,2	5,4 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 28. Jede Probe mit $1^1/_2$ ccm chols. Natron 1 Proz. versetzt.

Vergleichsprobe			Inaktiviertes Extrakt (70°)	
Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen
4,8	16,3	17,6	7,1	18,0
	— 4,8	— 4,8		— 7,1
	11,5	12,8		10,9 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 29. Jede Probe mit 2 ccm chols. Natron versetzt.

Vergleichsprobe			Inaktiviertes Extrakt (70°)		
Sofort	Nach $4\frac{1}{2}$ Std. im Brutofen		Sofort	Nach $4\frac{1}{2}$ Std. im Brutofen	
3,5	27,7	27,9	5,7	19,7	20,0
	— 3,5	— 3,5		— 5,7	— 5,7
	24,2	24,4		14,0	14,3 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Versuch 30.

Vergleichsproben		
Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen	
3,4	19,2	18,0
	— 3,4	— 3,4
	15,8	14,6

Ein und derselbe Glycerinextrakt.

Inaktiviert bei 50°			Inaktiviert bei 70°			Inaktiviert bei 100°		
Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 4 Std. im Brutofen		Sofort	Nach 4 Std. im im Brutofen	
5,1	14,1	14,8	5,1	14,8	15,7	5,2	14,7	14,3
	— 5,1	— 5,1		— 5,1	— 5,1		— 5.2	— 5,2
	9,0	9,7		9,7	10,6		9,5	9,1 ccm $^1/_{10}$ n-NaOH

Die Versuche ergaben mit großer Übereinstimmung eine Hemmungswirkung der durch Erwärmen inaktivierten Lipase in bezug auf die aktiven Fermentlösungen. Dieselbe ist in manchen der Versuche nur gering, in anderen dagegen sehr ausgesprochen, in allen Fällen aber durch die gleichsinnige Übereinstimmung der Parallelproben sichergestellt. Die Temperatur, bei der die Inaktivierung erfolgt, ist ohne wesentlichen Einfluß auf die Wirkung.

Eine Entscheidung der sich hier ergebenden Frage, ob es sich um die Wirkung eines dem Fermente von vornherein beigemengten und durch dasselbe maskierten „Antifermentes" handle, oder ob eine Umwandlung des Fermentes als solchen in einen unwirksamen Hemmungskörper erfolge, und ob ferner ein solcher Hemmungskörper („Zymoid") seine Wirkung einer Verankerung an das Angriffsobjekt verdanke, ist auf Grund des bisher vorliegenden Tatsachenmaterials vorderhand nicht möglich und muß weiteren Untersuchungen überlassen bleiben.

Zusammenfassung.

1. Die Aktivierung des Pankreassteapsins durch cholsaure Salze erfolgt derart, daß bis zu einer gewissen Grenze die Aktivität mit der Menge angewandter Cholsäure zunimmt. Von dieser Grenze angefangen, bewirkt jedoch ein weiterer Cholsäurezusatz keine weitere Steigerung der Aktivität.

2. Eine Beschleunigung der fermentativen Fettsynthese aus Fettsäure und Glycerin durch Cholsäure konnte nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden.

3. Pankreassteapsinpräparate können sich „spontan" derart verändern, daß ihre direkte Wirksamkeit zu-, ihre Aktivierbarkeit durch Cholsäure jedoch abnimmt.

4. Für die Gegenwart einer steapsinaktivierenden „Kinase" in der Darmschleimhaut ergab sich kein Anhaltspunkt.

5. Ricinuslipase erwies sich durch Cholsäure nicht aktivierbar.

6. Durch Erwärmen auf 60 bis 63° inaktiviertes Pankreassteapsin konnte durch normales Pferdeserum zum Teil reaktiviert werden. Dieser Vorgang ist durch ein in dem letzteren enthaltenes thermolabiles Agens bedingt. Bei 77 bis 80° inaktiviertes Pankreassteapsin ist einer Reaktivierung durch Blutserum anscheinend nicht mehr zugänglich.

7. Durch Erwärmen auf 70 bis 100° inaktiviertes Pankreassteapsin übt eine Hemmung auf die Wirkung des aktiven Fermentes gleicher Art aus.

8. Die Gesamtheit der vorliegenden Erfahrungen macht die Entstehung des Pankreassteapsins aus einem inaktiven Zymogen wahrscheinlich und läßt die komplexe Natur bzw. die Zusammensetzung des Fermentes aus einem thermostabilen und einem thermolabilen Anteile als möglich erscheinen.

Wien, Juli 1907.

Nachtrag bei der Korrektur.

Bezugnehmend auf eine neue interessante Mitteilung von V. Henri (intern. Physiologenkongreß in Heidelberg, August 1907), welche auf Grund ultramikroskopischer Beobachtungen eine Erklärung von Komplementwirkungen aus rein physikalischen Faktoren in das Bereich der Möglichkeit rückt, sei bemerkt, das obige Beobachtungen (6. und 7.) mit einer solchen Vorstellung ebensogut in Einklang gebracht werden können wie mit der Theorie der Komplemente.

XXV.

Über die Mengenverhältnisse und die physiologische Bedeutung der Oxyproteïnsäurefraktion des Harns.

Von **Wilhelm Ginsberg.**

Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. Otto v. Fürth im physiologischen Institut der k. k. Universität in Wien.

1.

Im Jahre 1865 teilte Carl Voit[1]) in seiner Arbeit „Über die Zersetzungsvorgänge der stickstoffhaltigen Stoffe im Tierkörper" die Entdeckung mit, daß sich im Harn außer den bekannten stickstoffhaltigen Stoffen eine stickstoff- und schwefelhaltige Substanz finde, die, ebenso wie Harnstoff, mit salpetersaurem Quecksilberoxyd eine Verbindung eingehe, deren Elementaranalyse ihm jedoch wegen der leichten Zersetzlichkeit derselben keine genau stimmenden Zahlen lieferte. Er verglich den Faktor C:N des Harns mit demjenigen des Harnstoffs und fand so, daß im Harn eine kohlenstoffreichere, stickstoffärmere Substanz, als es der Harnstoff ist, vorhanden sein müsse; er berechnete, daß „die Menge dieser Stoffe, deren Kohlenstoffgehalt bis 12 g pro Tag betragen kann, der Harnstoffausscheidung parallel geht; das heißt, wenn bei Zersetzung des Fleisches Harnstoff auftritt, auch eine bestimmte Menge anderer aus dem Fleische entstandener Produkte in den Harn übergeht".

Im nächsten Jahr hat Voit in Gemeinschaft mit Pettenkofer[2]) seine Entdeckung beim Menschen bestätigt und den

---

[1]) Zeitschr. f. Biologie 1, 127, 146—147.

[2]) M. v. Pettenkofer u. C. Voit, Untersuchungen über den Stoffverbrauch des normalen Menschen. Zeitschr. f. Biol. 2, 470f. (1866).

Kohlenstoffgehalt dieser unbekannten Verbindungen auf etwa 5 g pro Tag berechnet.

Im Jahre 1897 gelang es Bondzyński und Gottlieb[1]), aus dem Harn von Hunden eine neben Harnstoff durch salpetersaures Quecksilberoxyd fällbare Säure darzustellen und zu analysieren, die sie wegen ihrer Ähnlichkeit mit der Malyschen Peroxyprotsäure „Oxyproteïnsäure“ nannten. Die Darstellung dieser bei Phosphorvergiftung in vermehrter Menge auftretenden Verbindung war folgende:

Der zum dicken Sirup eingedampfte, mit Schwefelsäure angesäuerte Harn wurde mit dem fünffachen Volumen Alkohol gefällt, das Filtrat mit viel Wasser versetzt und mit Barytumhydroxyd im Überschuß gefällt, der Barytüberschuß durch Kohlensäure beseitigt, der Alkohol durch Erwärmen vertrieben und das stark eingeengte Filtrat in die vier- bis fünffache Menge Alkohol eingegossen. Es fiel ein voluminöser Niederschlag aus, der, aus wässeriger Lösung mit Alkohol umgefällt und getrocknet, ein gelbliches Pulver darstellte und zum größten Teile aus oxyproteïnsaurem Baryum bestand. Das Pulver wurde in Wasser gelöst, das Baryumsalz durch Schwefelsäure in die freie Säure übergeführt, das Filtrat unter Neutralisation mit Baryumhydroxyd mit salpetersaurem Quecksilberoxyd gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Durch Fällung mit Alkohol wurde ein weißes, sehr hygroskopisches Pulver erhalten, dessen Zusammensetzung etwa der Formel $C_{43}H_{82}N_{14}O_{31}S$ entsprach. Gottlieb und Bondzyński fanden weiterhin, daß der Stickstoffgehalt der Säure 2 bis 3 Proz. vom Gesamtharnstickstoff des Menschen und $2^1/_2$ Proz. von dem des Hundes ausmacht. Die pro Tag ausgeschiedene Menge betrug, als Baryumsalz berechnet, beim Menschen 3 bis 4 g, beim Hunde 10 g im Liter.

Töpfer[2]) gelangte bei Nachprüfung der obigen Angaben zu einem in braungefärbten Drusen kristallisierenden, sauren, durch alkalische Sublimatlösung fällbaren Produkte. Er berechnete im Harn die vorhandene Menge Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Alloxurkörper, Kreatinin und Hippursäure und fand so, daß von der Gesamtmenge des Harnstickstoffs nur ein Rest von $^1/_{10}$ Proz. für Substanzen unbekannter Art verbleibe.

---

[1]) St. Bondzyński und R. Gottlieb, Über einen bisher unbekannten Harnbestandteil, die Oxyproteïnsäure. Centralbl. f. d. med. Wiss. 33, 577 (1897).

[2]) Töpfer, Zur Kenntnis der unter dem Namen „Oxyproteïnsäuren“ beschriebenen Harnbestandteile. Centralbl. f. d. med. Wiss. 41, 705 (1897).

Cloëtta[1]) isolierte bei seinen Versuchen ein Gemenge von Säuren der Oxyproteïnsäuregruppe, das er „Uroprotsäure" nannte. Bei Zersetzung mit Schwefelsäure erhielt er Ameisensäure, Kohlensäure und Ammoniak.

Pregl[2]) ging 1899 auf die Voitschen Angaben zurück, isolierte ein nach dem damaligen Stande der Frage einheitlich erscheinendes Gemenge von Oxyproteïnsäuren und bestätigte die Zahlenwerte von Bondzyński und Gottlieb.

Pfaundler[3]) beschrieb eine Methode zur Aufteilung des Harnstickstoffs auf eine Reihe von Fraktionen. Eine derselben, und zwar diejenige, welche die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, den Stickstoff in fester Bindung enthaltenden Verbindungen umfaßt („Aminosäurenstickstoff"), entspricht ungefähr hinsichtlich ihrer Größenordnung jenen Zahlenwerten, welche Bondzyński und Gottlieb für den Stickstoff der Oxyproteïnsäure ermittelt hatten.

Im Jahre 1903 gelang es Bondzyński und Panek[4]), aus der Oxyproteïnsäure durch Bleiessigfällung eine andere Säure, die Alloxyproteïnsäure, zu isolieren, deren Anteil am Gesamtstickstoff sie mit 0,68 Proz. bezifferten. In 24 Stunden wurden 1,2 g Alloxyproteïnsäure ausgeschieden. Der nach Ausfällung der Alloxyproteïnsäure verbleibende Rest gab intensive Diazoreaktion. Die Autoren empfahlen zur Fällung der Oxyproteïnsäure Quecksilberacetat statt des Nitrats.

Donzé und Lambling[5]) berechneten die „Matières non dosées" im Harn, d. h. die Gesamtmenge derjenigen mangelhaft charakterisierten Substanzen, deren Quantum und Stickstoffgehalt bisher noch nicht bestimmt worden war, und fanden, daß diese Körper 2,5 bis 8,4 Proz. des Gesamtstickstoffs ausmachen.

Unter dem Namen Uroferrinsäure beschrieb ferner Thiele[6]) eine schwefelhaltige Säure von der Zusammensetzung $C_{35}H_{56}N_8SO_{13}$,

---

[1]) Max Cloëtta, Über die Uroprotsäure, einen neuen Bestandteil des Harnes. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 40, 29 (1897/98).

[2]) Fritz Pregl, Über die Ursachen der hohen Werte des C:N-Quotienten des normalen menschlichen Harns. Pflügers Arch. 75, 87 (1899).

[3]) Meinhard Pfaundler, Über ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harn. (A. d. physiol.-chem. Inst. in Straßburg.) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 76 (1900).

[4]) Bondzyński und Panek, Über die Alloxyproteïnsäure, einen normalen Harnbestandteil. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 2959 (1903).

[5]) Donzé und Lambling, Le non dosé organique de l'urine. Journ. de Phys. et de Pathol. gén. 5, 225 (1903). — Dieselben, Comptes rendus de la Soc. de biol. 1903, p. 1023.

[6]) O. Thiele, Über Uroferrinsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 251.

welche er nach einem, der Siegfriedschen Eisenammoniakalaunmethode zur Peptongewinnung nachgebildeten Verfahren aus Harn isoliert hatte. Die Säure gibt nicht die typischen Eiweißreaktionen, ist leicht löslich in Wasser und Methylalkohol, schwer löslich in absolutem Alkohol, ist bereits aus verdünnter Lösung durch Phosphorwolframsäure und Quecksilbersalze fällbar und gibt bei hydrolytischer Spaltung Melanin, Kohlensäure, Ammoniak, Schwefelsäure, Schwefelwasserstoff und Asparaginsäure. Die Existenz dieser Verbindung wurde von Bondzyński und seinen Mitarbeitern in Zweifel gezogen.

Im Jahre 1905 gelang Bondzyński, Dombrowski und Panek[1]) die Darstellung einer dritten Oxyproteïnsäure. Sie fanden, daß nach Abfiltrieren des bei saurer Reaktion durch Quecksilberacetat ausfallenden Niederschlags beim Neutralisieren mit Natriumkarbonat ein weiterer reichlicher Niederschlag sich ausscheidet. Sie bezeichnen die bei saurer Reaktion ausfallende Substanz als Antoxyproteïnsäure, die andere Säure nannten sie Oxyproteïnsäure und fanden die Diazoreaktion nach Ehrlich an erstere geknüpft.

Durch Extraktion mit heißem Alkohol aus dem Niederschlag des mit Phosphorwolframsäure gefällten Harns stellte Paul Hári[2]) einen stickstoffhaltigen Körper von saurem Charakter und der empirischen Zusammensetzung $C_{30}H_{55}N_2O_{18}$ dar, der sich als in Wasser und Alkohol kaum, in Äther, Chloroform und Benzol gar nicht löslich erwies und sich, wie Hári betont, in seinem Verhalten von der Oxyproteïnsäure und Alloxyproteïnsäure unterscheidet.

Abderhalden und Pregl[3]) haben durch Dialyse aus dem Alkoholextrakte des Harns ein Gemenge von Stoffen isoliert, das keine freien Aminosäuren enthielt, bei der hydrolytischen Zersetzung jedoch Benzoësäure, Leucin, Alanin und Phenylalanin lieferte.

E. Salkowski[4]) fand, daß, während in normalem Harn der Stickstoffgehalt des Alkoholniederschlages etwa 3 bis 5 Proz. des Gesamtstickstoffs, in pathologischen Harnen 8 bis 9 Proz. ausmacht,

[1]) St. Bondzyński, St. Dombrowski und K. Panek, Über die Gruppe von im normalen Menschenharn enthaltenen stickstoff- und schwefelhaltigen organischen Säuren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 83 (1905).

[2]) Paul Hári, Über einen neuen stickstoffhaltigen Bestandteil des normalen Menschenharns. Zeitschr. f. physiol. Chem. 46, 1 (1905).

[3]) E. Abderhalden und F. Pregl, Über einen im normalen menschlichen Harn vorkommenden schwer dialysierbaren Eiweißabkömmling, ebenda, S. 19.

[4]) E. Salkowski, Zur Kenntnis der alkoholunlöslichen bzw. kolloidalen Stickstoffsubstanzen des Harns. Berl. klin. Wochenschr. 42, 1581 u. 1618 (1905).

dieser Wert bei einem Fall von Phosphorvergiftung auf 28 Proz. anstieg und er glaubte, diesen Anstieg in erster Linie auf ein schwer dialysables, kolloidales, durch Säure hydrolysierbares, stickstoffhaltiges Kohlehydrat beziehen zu sollen.

Ferner bestimmten Eliacheff[1]), sowie kürzlich Sasaki[2]) und Savaré[3]) die Menge der im Harn auftretenden nicht dialysablen Stoffe und fanden eine Vermehrung der adialysablen Stoffe im Fieber und bei Eklampsie. Die Menge derselben im normalen Harn beträgt nach Sasaki 0,218 bis 0,68 g im Liter.

Endlich hat in allerjüngster Zeit Liebermann[4]) unter Siegfrieds Leitung festgestellt, daß in den im Menschenharn vorkommenden organischen Säuren, die unlösliche Quecksilbersalze und wasserlösliche, aber alkoholunlösliche Baryumsalze bilden, ein Teil des Schwefels in Form von Ätherschwefelsäure enthalten sei. Er betont, daß die Alloxyproteïnsäure keine einheitliche Substanz sei und daß sich aus ihrer mit Ammonsulfat gesättigten Lösung durch Eisenalaun eine Substanz isolieren lasse, die sich wie die Uroferrinsäure Thieles (s. o.) verhalte und als eine Ätherschwefelsäure anzusehen sei.

Die Gesamtheit der vorliegenden, einander in vielfacher Hinsicht widersprechenden Angaben deutet darauf hin, daß der Harn unter normalen und pathologischen Bedingungen eine Reihe komplizierter und anscheinend hoch molekularer Substanzen in nicht unerheblicher Menge enthält, die zwar nicht die typischen Eiweißreaktionen zeigen, jedoch zum Eiweißstoffwechsel in Beziehung stehen dürften und von denen manche (wie aus dem erwähnten Befund von Abderhalden und Pregl hervorgeht) vielleicht geradezu als Polypeptide aufgefaßt werden könnten. Ob allerdings gerade die Oxyproteïnsäuren mit diesen polypeptidartigen Stoffen in Zusammenhang stehen bzw. mit denselben identisch sind, war den bisher vorliegenden Angaben nicht zu entnehmen.

Eine der Aufgaben der im folgenden mitgeteilten Untersuchungen war es, diesen Zusammenhang aufzuklären.

---

[1]) P. Eliacheff, Memoires de la soc. de Biol. [9] 3 (1891).

[2]) Kumoji Sasaki, Bestimmung der nicht dialysablen Stoffe des Harns. (A. d. physiol.-chem. Inst. Straßburg.) Diese Beiträge 9, 386 (1907).

[3]) M. Savaré, Der Gehalt des Frauenharns an adialysablen Stoffen unter normalen und pathologischen Verhältnissen, ebenda, S. 401.

[4]) H. Liebermann, Über die Gruppe von N- und S-haltigen organischen Säuren, welche im normalen Menschenharn enthalten sind. (A. d. chem. Abt. d. physiol. Inst. Leipzig.) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52 (1, 2), Juni 1907.

Vor allem habe ich mich aber bemüht, eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Substanzen der Oxyproteïnsäuregruppe im Harn auszuarbeiten und mit Hilfe derselben die Bedingungen für ihr Auftreten unter normalen und pathologischen Verhältnissen und insbesondere einen etwaigen Zusammenhang derselben mit dem Eiweißzerfall im Organismus klarzulegen. Der Frage der chemischen Individualität der Alloxyproteïnsäure, der Antoxyproteïnsäure und der Oxyproteïnsäure bin ich, wie ich ausdrücklich betonen möchte, nicht näher getreten und es werden obige Bezeichnungen im Sinne der Definition Bondzyńskis und seiner Mitarbeiter einfach der Kürze halber zur Charakterisierung einer bestimmten Harnfraktion ohne Rücksicht auf deren tatsächliche Einheitlichkeit oder Nichteinheitlichkeit gebraucht.

2. Methode zur quantitativen Bestimmung der Oxyproteïnsäurenfraktion.

Methode A. Zum Zwecke der quantitativen Bestimmung der Oxyproteïnsäuren gingen wir nach mannigfachen Vorversuchen zunächst in folgender Weise vor:

Eine Menge von 1000 ccm Harn (dessen Gesamtstickstoffgehalt vorher nach Kjeldahl bestimmt worden war) wird mit heißgesättigter Baryumhydroxydlösung im Überschuß gefällt, durch Kohlensäure vom Barytüberschuß befreit, ein aliquoter Teil heiß filtriert und auf dem Wasserbade eingedampft. Der Trockenrückstand wird mehrmals mit heißem Alkohol extrahiert, bis das Extrakt keine Harnstoffreaktion nach Lüdy oder nach Schiff mehr gibt, dann unter Rückflußkühlung mit Äther extrahiert, der Äther abgegossen und der Rückstand in Wasser gelöst. Aus dieser Fraktion (die weder Harnstoff, noch Harnsäure, noch Ammoniak mehr enthalten soll) wird mit Bleiessig, unter sorgsamster Vermeidung eines Überschusses, die „Alloxyproteïnsäure" ausgefällt und der Stickstoffgehalt des Niederschlages nach Kjeldahl bestimmt. Im Filtrat wird durch Quecksilberacetat unter Sodazusatz die Summe der Antoxyproteïnsäure und Oxyproteïnsäure ausgefällt und ihr Stickstoffgehalt bestimmt. Um eine vollständige Fällung zu erzielen, wird eine heißgesättigte Lösung von Quecksilberacetat und eine verdünnte Sodalösung abwechselnd so lange zugesetzt, als der Niederschlag weiß ausfällt. Eine Gelbfärbung des Niederschlages zeigt den Endpunkt der Reaktion an.

Bei Anwendung dieser Methode ergeben sich folgende Nachteile:

1. Es sind zwar die gereinigten Baryumsalze der drei Oxyproteïnsäuren in Alkohol unlöslich, aber die ungereinigten Salze gehen, wenn auch in geringem Maße, in den heißen Alkohol über, so daß Verluste unvermeidlich sind;

2. ist die langdauernde, wiederholte Alkoholextraktion recht umständlich, abgesehen davon, daß manchmal immer noch Harnstoff und Ammoniakspuren in dem Extrakt zurückbleiben und eigene Korrekturen erfordern;

3. ist eine scharfe Trennung der Alloxyproteïnsäurefraktion von den beiden anderen Oxyproteïnsäuren mit Hilfe der Bleiessigfällung unmöglich, insofern der voluminöse Niederschlag stets einen Teil der letzteren mitreißt (vgl. die einschlägigen Angaben Bondzyński's und seiner Mitarbeiter).

Wir haben daher späterhin auf eine gesonderte Bestimmung der Alloxyproteïnsäure ganz verzichtet und die Methode in folgender Weise modifiziert:

Methode B. Nach der Baryt- und Kohlensäurebehandlung wird das Filtrat nicht zur Trockne gedampft, sondern nur bis zum dünnen Sirup eingeengt und dieser nach dem Prinzip von Mörner-Sjöquist mit Ätheralkohol (1:2) erschöpft. Dies wird dadurch erreicht, daß der Sirup, mit der zwanzigfachen Volummenge Ätheralkohol versetzt und gut durchgeschüttelt, 24 Stunden in verschlossenem Gefäß stehen bleibt, dann die Flüssigkeit von dem abgesetzten Niederschlag oder Sirup abgegossen, der Rückstand mehrmals (eventuell auf dem Filter) mit Ätheralkohol gewaschen und dann in Wasser gelöst wird. Diese Fraktion bezeichne ich als „Barytfraktion“. In ihr sind Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Kreatin, Kreatinin, Hippursäure nicht vorhanden, sondern anscheinend nur die Baryumsalze der drei Oxyproteïnsäuren und ein derzeit noch unbekannter, stickstoffhaltiger Rest. Die Gesamtheit der Oxyproteïnsäuren wird durch Quecksilberacetat unter Sodazusatz ausgefällt und ihr Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

Von größter Wichtigkeit für die Brauchbarkeit der Methode war die Feststellung, ob der Oxyproteïnsäurenniederschlag tatsächlich frei von Harnstoff und Ammoniak sei.

Zur qualitativen Prüfung auf Harnstoff dienten die Reaktionen mit Orthonitrobenzaldehyd (nach Lüdy), sowie mit Furfurol (nach Schiff), wobei sich bei richtiger Ausführung die letztere als die weitaus leistungsfähigere erwies [1]).

Die Prüfung der „Barytfraktion“ mit Furfurol wurde in sehr vielen Fällen vorgenommen und fiel stets vollkommen negativ aus.

[1]) Empfindlichkeit:

Konzentration der Harnstofflösung:	1 Proz.	0,5 Proz.	0,1 Proz.	0,05 Proz.
Reaktion mit O-Nitrobenzaldehyd:	deutlich	undeutlich	?	—
„ „ Furfurol	„	deutlich	deutlich	deutlich.

Um jedoch in dieser Hinsicht völlig sicher zu gehen und überdies gleichzeitig eine etwaige Verunreinigung der Oxyproteïnsäuren mit Ammoniak auszuschließen, verfuhren wir derart, daß wir nach dem der Schöndorffschen Harnstoffbestimmungsmethode zugrunde liegenden Prinzip eine Probe der betreffenden Fraktion 4 bis 5 Stunden lang mit Metaphosphorsäure auf 150° erhitzten und sodann das entstandene Ammoniak durch Destillation mit Magnesia bestimmten. Der Versuch fiel entweder vollkommen negativ aus (Versuch II/8, XII/4, XIII/5, XXVI/3) oder gab nur geringe, praktisch kaum in Betracht kommende Ausschläge (Versuch VII/3 und XIX/D4.)

Nur in einem (pathologischen) Falle (Versuch XXV/4) gab die Bestimmung gleichzeitig mit einem abnorm hohen Wert für die Oxyproteïnsäuren einen größeren Ammoniakwert, der jedoch angesichts der negativen Furfurolprobe schwerlich auf eine Harnstoffbeimengung, sondern vermutlich auf Beimengung irgend eines abnormen, locker gebundenen Stickstoff enthaltenden Harnbestandteils bezogen werden dürfte (s. u.).

Wir haben uns gelegentlich über die Abwesenheit des Harnstoffs überdies auch in der Weise Sicherheit verschafft, daß wir den zum Waschen des barythaltigen Niederschlags benutzten Alkoholäther abdunsteten und in dem Rückstande die Abwesenheit von Harnstoff feststellten, oder besser noch in der Weise, daß wir die Barytfraktion noch einmal in wenig Wasser lösten, mit Alkoholäther fällten und dann die überstehende Flüssigkeit der Prüfung unterwarfen.

Das Fehlen von Harnsäure in der „Barytfraktion" wurde mit Hilfe der Murexidreaktion, die Abwesenheit von Kreatinin und Kreatin mit Hilfe der Reaktionen nach Weyl und Jaffé sowohl direkt, als nach vorausgegangener Hydrolyse sichergestellt. Auch die Hippursäure geht, dank der Alkohollöslichkeit ihrer Erdalkalisalze, nicht in die Barytfraktion über[1]); die Abwesenheit derselben wurde durch einen Bestimmungsversuch nach Bunge und Schmiedeberg (Versuch III/6) erwiesen. Auch ist in dieser Hinsicht die Beobachtung bemerkenswert, daß selbst nach sechsstündiger Extraktion der durch Schwefelsäure in Freiheit gesetzten Oxyproteïnsäuren mit Äther in der Wärme keine meßbare Menge einer stickstoffhaltigen Substanz in Lösung geht (Versuch II/10).

Für die Gegenwart von Urochrom in unseren Lösungen ergab sich kein Anhaltspunkt.

Andere stickstoffhaltige Substanzen kommen ihrer Menge nach für den menschlichen Harn praktisch kaum in Betracht. Manche, wie z. B. die Xanthinbasen, konnten in jenen Fällen direkt ausgeschlossen werden, wo die Prüfung der Barytfraktion mit Phosphorwolframsäure überhaupt keine Fällung gab. Es war dies aber schon aus dem Grunde nicht immer der Fall, als eine der Oxyproteïnsäuren, die Antoxyproteïnsäure, aus konzentrierteren Lösungen durch dieses Reagens gefällt wird.

Für den Hundeharn mußte jedoch noch an die Möglichkeit einer Beimengung von Kynurensäure und Allantoin gedacht werden. Auf die Gegenwart der ersteren wurde mit der Jafféschen Reaktion mit negativem Erfolge geprüft (Versuch XIII). Dagegen konnte die Gegenwart von Allan-

---

[1]) Vgl. Hammarstens Lehrbuch, 6. Aufl. 1907, S. 562.

toin nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, es wurde daher in mehreren Fällen durch Bestimmung desselben nach dem Verfahren von Löwi eine (das Resultat übrigens nicht wesentlich beeinflussende) Korrektur eingeführt (Versuch XIII/6 und XIV/5). Bei der Mehrzahl der übrigen Versuche konnte das Allantoin vernachlässigt werden, da die Ausscheidung desselben, übereinstimmenden Literaturangaben zufolge, im Hunger auf einen minimalen Wert absinkt.

Schließlich sei noch erwähnt, daß wir, um uns Sicherheit darüber zu verschaffen, ob die Fällung der Oxyproteïnsäuren bei Gegenwart von Alkali eine vollständige ist und sich nicht etwa ein Teil des Niederschlages im Überschuß des Fällungsmittels von neuem löst, derart vorgingen, daß wir in einem Falle (Versuch III/6) das Filtrat der Oxyproteïnsäurefällung mit Salzsäure schwach ansäuerten, durch Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreiten, stark einengten und neuerlich durch vorsichtigen Zusatz von Quecksilberacetat auf die Gegenwart von Oxyproteïnsäuren prüften. Es fiel aber keine organische Quecksilberverbindung mehr aus.

3. Versuche mit Menschenharn.

Versuch I. Normaler Harn. 1000 ccm normalen Menschenharns werden mit heißgesättigter Barytlösung im Überschuß gefällt; der Barytüberschuß wird durch Kohlensäure entfernt, vom Gesamtvolumen (1580 ccm) ein Quantum von 500 ccm abfiltriert, das Filtrat zuerst in einer Schale, dann in einem Soxhletkolben stark eingeengt, schließlich am Trockenschrank getrocknet, der Trockenrückstand viermal je eine Stunde lang mit heißem Alkohol extrahiert. Im vierten, farblosen Alkoholextrakt fällt die Harnstoffprobe nach Lüdy negativ aus, die Furfurolreaktion ist schwach angedeutet. Dann wird unter Rückflußkühlung mit Äther extrahiert und der Rückstand mit destilliertem Wasser zu 300 ccm gelöst.

1. Gesamtstickstoff: a) 10 ccm Harn = 0,108 g N; b) 10 ccm Harn = 0,105 g N. (1000 ccm Harn = 10,65 g N.)

2. Gesamtstickstoff der Barytfraktion: a) 20 ccm Barytfraktion = 7,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 64 g N; b) 20 ccm = 7,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 06 g N. (1000 ccm Harn = 0,5043 g N bzw. 0,5242 g N.)

3. Stickstoff der Alloxyproteïnsäurefraktion: a) 50 ccm Barytfraktion = 0,001 82 g N; b) 50 ccm = 0,001 75 g N. (1000 ccm Harn = 0,0564 g N.)

4. Stickstoff des aus dem Filtrat der Bleiessigfällung durch Quecksilberacetat und Soda ausgefällten Niederschlages: a) 50 ccm Barytfraktion = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 04 g N. (In 1000 ccm Harn = 0,3805 g N.)

5. Stickstoff des dazugehörigen Filtrats: 50 ccm Barytfraktion = 3,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 76 g N. (1000 ccm Harn = 0,150 42 g N.)

Der Stickstoff der Barytfraktion verteilt sich sonach auf:

Alloxyproteïnsäure	0,0564 g N
Antoxyproteïnsäure und Oxyproteïnsäure	0,3805 „
Filtrat	0,1504 „
	0,5873 g N

entsprechend 1000 ccm Harn, während die direkte Gesamt-N-Bestimmung im Mittel 0,5143 ergeben hatte.

Versuch II. Normaler Harn. Von 3000 ccm normalen Menschenharns werden 500 ccm abgemessen, wie oben mit Barytwasser und Kohlensäure behandelt. Von 1200 ccm wird ein Quantum von 730 ccm abfiltriert, eingedampft, dreimal mit heißem Alkohol je ein bis anderthalb Stunden, einmal mit Ätheralkohol (1 : 2) im Soxhletapparat extrahiert.

Im ersten Alkoholextrakt ist außer Harnstoff auch Kreatinin durch die Jaffésche und die Weylsche Reaktion nachweisbar. Im dritten Extrakt ist kein Harnstoff und kein Kreatinin mehr nachweisbar. Der in Alkohol unlösliche Rückstand wird in Wasser gelöst und auf 300 ccm gebracht. In dieser Lösung war Harnstoff und Ammoniak noch vorhanden, Kreatinin und Harnsäure völlig entfernt.

1. Gesamt-N: a) 10 ccm Harn = 0,093 38 g N; b) 10 ccm = 0,093 38 g N. (1000 ccm Harn = 9,34 g N bzw. 9,34 g N.)

2. Gesamt-N der Barytfraktion: a) 20 ccm der Barytfraktion = 4,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 88 g N; b) 10 ccm = 2,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,002 94 g N. (1000 ccm Harn = 0,2464 g N bzw. 0,2464 g N.)

3. Ammoniak-N: 50 ccm Barytfraktion werden über MgO destilliert: a) 50 ccm = 1,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3; b) 50 ccm = 1,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,001 68 g N; c) = 1,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3. (1000 ccm Harn = 0,028 g N.)

4. Ammoniak und Harnstoff-N: 20 ccm der Barytfraktion werden $4^1/_2$ Stunden im Ölbade bei 150° mit 10 g Metaphosphorsäure erhitzt, dann nach vorsichtiger Neutralisation mit Natronlauge mit Magnesia usta destilliert; a) 20 ccm = 1,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,001 68 g N; b) 20 ccm = 1,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0014 g N. (1000 ccm Harn = 0,07 g N bzw. 0,059 g N, Mittel 0,065 g N.)

Es müssen also 0,065 g N als Korrektur von 0,2464 g N abgezogen werden. Das Verhältnis des Stickstoffs der Barytfraktion (korrigiert zu 0,181 g N) zum Gesamtstickstoff ergibt sich demnach: $N_{Ba} : N_{ges}$ = 0,181 : 9,34.

Sodann wird die Hauptmenge des Harns bis zur Herstellung der Barytfraktion analog behandelt, jedoch zur Beseitigung des Harnstoffrestes länger mit Alkohol extrahiert und die Barytfraktion auf ein Volumen von 1000 ccm gebracht.

5. Gesamt-N der Barytfraktion: a) 20 ccm der Barytfraktion = 4,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0056 g N; b) 20 ccm = 4,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0063 g N. (1000 ccm der Barytfraktion = 0,28 g N bzw. 0,31 g N, Mittel 0,29 g N.)

Aus dieser Zahl wird nach der sub 1 und 4 berechneten Proportion die der Gesamtmenge der Barytfraktion entsprechende Harnmenge auf 1600 ccm Harn berechnet und den weiteren Analysen zugrunde gelegt.

6. Alloxyproteïnsäure-N: 50 ccm der Barytfraktion = 4,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 16 g N. (1000 ccm Harn = 0,077 g N.)

7. Gesamtoxyproteïnsäuren-N: 20 ccm der Barytfraktion = 3,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 34 g N. (1000 ccm Harn = 0,135 g N.)

8. Harnstoff und Ammoniak-N: 20 ccm der Barytfraktion = 0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

9. Ätherextraktion: 50 ccm der Barytfraktion werden mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und im Schacherlapparate 6 Stunden lang mit Äther extrahiert. Dann wird der Extraktionsäther abgegossen, abgedampft und der Rückstand im Kjeldahlkolben zersetzt. 50 ccm = 0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

Versuch III. Normaler Harn. 3000 ccm normalen Harns werden nach der Methode B (S. 417) verarbeitet und die Barytfraktion auf 2000 ccm aufgefüllt. Die Furfurolreaktion auf Harnstoff fiel negativ aus, ebenso die Prüfung auf Kreatin, Kreatinin und Xanthinbasen. Da bei Phosphorwolframsäurezusatz kein Niederschlag entstand, war auch kein Ammoniak vorhanden. Harnsäure war nicht nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 35,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,05 g N; b) 10 ccm = 70,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0987 g N; c) 10 ccm = 71 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0994 g N. (1000 ccm Harn = 9,998 g N bzw. 9,87 g N und 9,94 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 15,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,021 14 g N; b) 20 ccm = 15,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,022 12 g N. (1000 ccm Harn = 0,705 g N bzw. 0,737 g N.)

3. Alloxyproteïnsäuren-N: a) 100 ccm Barytfraktion = 14,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,020 72 g N; b) 50 ccm = 8,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 48 g N. (1000 ccm Harn = 0,138 g N bzw. 0,153 g N.)

4. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 12 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0168 g N; b) 50 ccm = 24 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0336 g N; c) 20 ccm = 11,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 54 g N. (1000 ccm Harn = 0,56 g N bzw. 0,448 g N und 0,518 g N.)

5. 50 ccm werden zum Hippursäurenachweis nach Bunge und Schmiedeberg verwandt. Ergebnis negativ.

6. Direkte Bestimmung des Reststickstoffs. Zur direkten Bestimmung jenes Stickstoffrestes, der sich in der Barytfraktion nach Beseitigung der Oxyproteïnsäuren findet, wurde die Fällung derselben in einem Teil der Barytfraktion mit Quecksilberacetat unter Sodazusatz durchgeführt, das Filtrat von Quecksilber befreit und der N-Gehalt desselben ermittelt. 1000 ccm Harn entsprechend, fand sich ein Stickstoffrest von 0,160 g. Durch Subtraktion der Mittelwerte von 2. Gesamt-N = 0,721 und 4. Oxyproteïnsäuren-N = 0,509 ergibt sich 0,212 als berechneter Kontrollwert.

Versuch IV. Normaler Harn. 750 ccm normalen Menschenharns auf 75 ccm eingeengt, wie sub III behandelt. Aliquoter Teil der Baryumfällung filtriert (von 340 ccm : 250 ccm). Die Alkoholätherfällung wie oben. Der ausgewaschene Rückstand zu 255 ccm gelöst. Prüfung auf Harnstoff, Harnsäure, Ammoniak, Kreatin, Kreatinin, Xanthinbasen, Hippursäure fiel negativ aus.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 29,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,041 86 g N; b) 5 ccm = 30,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,043 12 g N; c) 5 ccm = 30,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,042 42 g N. (1000 ccm Harn = 8,36 g N bzw. 8,62 g N und 8,48 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 g N; b) 20 ccm = 9,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,013 g N. (1000 ccm Harn = 0,317 g N bzw. 0,298 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 g N; b) 20 ccm = 8,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 76 g N. (1000 ccm Harn = 0,27 g N bzw. 0,27 g N.)

4. Alloxyproteïnsäuren-N: a) 50 ccm Barytfraktion = 10,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 56 g N; b) 50 ccm = 10,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 56 g N. (1000 ccm Harn = 0,132 g N bzw. 0,132 g N.)

Versuch V. Normaler Harn. 900 ccm normalen Menschenharns werden wie oben behandelt. Von 450 ccm der Baryumfällung werden 360 ccm abfiltriert. Der Ätheralkoholrückstand wird zu 800 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 45,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,063 98 g N; b) 5 ccm = 46,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,064 54 g N. (1000 ccm Harn = 12,8 g N bzw. 12,9 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 7,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 64 g N; b) 10 ccm = 7,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 36 g N. (1000 ccm Harn = 0,443 g N bzw. 0,431 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 14,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,019 88 g N; b) 20 ccm = 14,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,020 02 g N. (1000 ccm Harn = 0,414 g N bzw. 0,417 g N.)

4. Alloxyproteïnsäuren-N: a) 50 ccm Barytfraktion = 8,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 08 g N; b) 50 ccm = 10 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 g N. (1000 ccm Harn = 0,10 g N bzw. 0,1166 g N.)

Versuch VI. Normaler Harn. 1000 ccm Harn wie oben behandelt; von 750 ccm Baryumfällung werden 600 ccm filtriert. Der ausgewaschene Alkoholätherrückstand zu 360 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 36,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0508 g N; b) 5 ccm = 35,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0497 g N. (1000 ccm Harn = 10,16 g N bzw. 9,94 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 9,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 88 g N; b) 10 ccm = 8,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 46 g N. (1000 ccm Harn = 0,5796 g N bzw. 0,5585 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 14,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0203 g N; b) 20 ccm = 14,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0203 g N. (1000 ccm Harn = 0,4567 g N bzw. 0,4567 g N.)

Versuch VII. Normaler Harn. 500 ccm Harn wie oben behandelt; von 1400 ccm der Barytfällung werden 1200 ccm filtriert. Der ausgewaschene Ätheralkoholrückstand zu 400 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 45,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,063 98 g N; b) 10 ccm = 90,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,127 26 g N. (1000 ccm Harn = 12,7 g N bzw. 12,7 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 10,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 14 g N; b) 20 ccm = 10,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 28 g N. (1000 ccm Harn = 0,66 g N bzw. 0,666 g N.)

3. Ammoniak- und Harnstoff-N: 75 ccm Barytfraktion mit 35 g Metaphosphorsäure bei 150° 5 Stunden erhitzt, dann neutralisiert und mit Magnesia usta destilliert; 75 ccm = 3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N. (1000 ccm Harn = 0,0523 g N, d. i. 7,9 Proz. des Barytfraktion-N.)

Versuch VIII. Carcinoma pylori, Kachexie. 850 ccm Harn, der frei von Eiweiß ist und keine Diazoreaktion gibt, werden wie oben behandelt. Von 320 ccm der Barytfällung werden 280 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 410 ccm gelöst. In der Barytfraktion fällt die Furfurolprobe auf Harnstoff negativ aus.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 17,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,023 94 g N; b) 5 ccm = 17,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,024 18 g N. (1000 ccm Harn = 4,8 g N bzw. 4,8 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N; b) 10 ccm = 3,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,00448 g N. (1000 ccm Harn = 0,231 g N bzw. 0,21 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 3,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,00504 g N; b) 20 ccm = 4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0056 g N. (1000 ccm Harn = 0,1386 g N bzw. 0,154 g N.)

Versuch IX. Puerperalsepsis, Fieber bis 40,6°. 1100 ccm Harn wie oben behandelt, von 535 ccm Barytfällung werden 415 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 490 ccm gelöst. Die Furfurolreaktion auf Harnstoff fiel negativ aus. Ammoniak nicht nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 38,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,05418 g N; b) 5 ccm = 37,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0518 g N. (1000 ccm Harn = 10,8 g N bzw. 11,4 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 9,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,01344 g N; b) 10 ccm = 9,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,01372 g N. (1000 ccm Harn = 0,8145 g N bzw. 0,83 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 13,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,01862 g N; b) 25 ccm = 16,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,02338 g N. (1000 ccm Harn = 0,5642 g N bzw. 0,5659 g N.)

4. Mercuronitratniederschlags-N: Beim Fällen in alkalischer Lösung scheidet sich ein reichlicher weißer Niederschlag aus, der sich unter Abscheidung von Quecksilber rasch schwärzt. Es wird deshalb beim Filtrieren mit Essigsäure angesäuert und mit essigsäurehaltigem Wasser gewaschen; a) 25 ccm Barytfraktion = 3,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N; b) 25 ccm = 3,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,00476 g N. (1000 ccm Harn = 0,1016 g N bzw. 0,1152 g N.)

5. Mercurinitratniederschlag-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 9,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0133 g N; b) 25 ccm = 10,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 g N. (1000 ccm Harn = 0,322 g N bzw. 0,339 g N.)

6. Phosphorwolframsäureniederschlag-N: (entsprechend der Antoxyproteïnsäure?) 25 ccm = 2,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,00836 g N. (1000 ccm Harn = 0,0813 g N.)

Versuch X. Perniziöse Anämie. 940 ccm Harn wie oben behandelt. Von 775 ccm Baryumfällung werden 720 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand zu 360 ccm gelöst. In der Barytfraktion kein Harnstoff, Kreatinin oder Harnsäure nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 23,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,03276 g N; b) 5 ccm = 23,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,03248 g N. (1000 ccm Harn = 6,55 g N bzw. 6,49 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 6,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0091 g N; b) 10 ccm = 6,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,00882 g N. (1000 ccm Harn = 0,3751 g N bzw. 0,3633 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: 20 ccm Barytfraktion = 9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0126 g N. (1000 ccm Harn = 0,2596 g N.)

Versuch XI. Ulcus ventriculi, Fieber, Kachexie. 340 ccm Harn wie oben behandelt. Von 300 ccm Barytfällung werden 260 ccm filtriert. Der in Ätheralkohol unlösliche, gut ausgewaschene Rückstand zu 140 ccm

gelöst. In der Barytfraktion kein Harnstoff, Kreatinin oder Harnsäure nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 18,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0259 g N; b) 5 ccm = 19,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0266 g N. (1000 ccm Harn = 5,18 g N bzw. 5,32 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 18 g N; b) 20 ccm = 6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0084 g N. (1000 ccm Harn = 0,2461 g N bzw. 0,20 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: 40 ccm Barytfraktion = 8,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0119 g N. (1000 ccm Harn = 0,14 g N.)

Versuch XII. Eklampsie. 900 ccm Harn werden wie oben verarbeitet. Von 1700 ccm Barytfällung werden 1600 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 200 ccm gelöst. In der Barytfraktion fällt die Furfurolprobe negativ aus. Ammoniak nicht nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 10 ccm Harn = 53,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,075 18 g N; b) 10 ccm = 53,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,075 04 g N. (1000 ccm Harn = 7,5 g N.)

2. Barytfraktion-N: 20 ccm Barytfraktion = 7,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 78 g N. (1000 ccm Harn = 0,126 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 30 ccm Barytfraktion = 7,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 06 g N; b) 30 ccm = 8,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 34 g N. (1000 ccm Harn = 0,086 g N bzw. 0,089 g N.)

4. Ammoniak- und Harnstoff-N: 50 ccm Barytfraktion mit 2,5 g Metaphosphorsäure bei 150° 5 Stunden erhitzt, dann neutralisiert, mit Magnesia usta destilliert; 50 ccm = 0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

Ein Blick auf die nebenstehende Tabelle lehrt folgendes:

Beim normalen Menschen fand sich einer Ausscheidung von 8,3 bis 12,7 g Stickstoff im Liter entsprechend (wenn wir vom Versuch II absehen, wo infolge Anwendung der Alkoholextraktionsmethode die Oxyproteïnsäurezahlen zu klein ausgefallen sein dürften) ein Quantum von 0,27 bis 0,51 g Oxyproteïnsäurestickstoff, was 3,1 bis 5 Proz. des Gesamtstickstoffs ausmacht. Eine genaue Umrechnung auf das Gewicht ausgeschiedener Oxyproteïnsäuren ist nicht möglich, da der Stickstoffgehalt der drei von Bondzyński[1]) und seinen Mitarbeitern isolierten Säuren außerordentlich verschieden ist (Mittelwert: Alloxyproteïnsäure 13,55 Proz., Oxyproteïnsäure 18,08 Proz., Antoxyproteïnsäure 24,4 Proz. N). Ein ungefährer Überschlag lehrt jedoch, daß dieser Stickstoffmenge etwa $1^1/_2$ bis $3^1/_2$ g dieser Säure im Liter entsprechen dürfte.

Bedenkt man, daß die Menge im Harn ausgeschiedener Harnsäure beim Menschen für gemischte Kost im Mittel 0,7 g, die des Kreatinins 1 g, die der Hippursäure 0,7 g in 24 Stunden[2]) aus-

---

[1]) l. c.

[2]) Vgl. Hammarstens Lehrbuch, 6. Aufl. 1907, S. 627.

Zusammenstellung der Versuche mit Menschenharn.

Versuchs-Nummer	Art	In einem Liter Harn						Gesamt-N					Baryt-N			
				Oxyproteïnsäuren-N					Oxyproteïnsäuren-N				Oxyproteïnsäuren-N			
		Gesamt-N	Baryt-N	Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N	Alloxyproteïnsäure-N	Antoxyproteïnsäure + Oxyproteïnsäure-N	Rest-N	Baryt-N	Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N	Alloxyproteïnsäure-N	Antoxyproteïnsäure + Oxyproteïnsäure-N	Rest-N	Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N	Alloxyproteïnsäure-N	Antoxyproteïnsäure + Oxyproteïnsäure-N	Rest-N
		g	g	g	g	g	g	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
I.	Normal	10,05	0,514	0,436	0,056	0,380	0,078	5,0	4,3	0,5	3,8	0,7	74,0	10,0	64,0	26,0
II.	„	9,34	0,181	0,135	0,077	0,058	0,046	1,9	1,4	0,8	0,6	0,5	74,5	42,5	32,0	25,5
III.	„	9,93	0,721	0,509	0,145	0,364	0,212	7,2	5,0	1,4	3,6	2,2	70,6	20,1	50,5	29,4
IV.	„	8,36	0,307	0,27	0,132	0,138	0,037	3,5	3,1	1,4	1,7	0,4	90,0	41,0	49,0	10,0
V.	„	12,8	0,437	0,414	0,108	0,306	0,023	3,4	3,3	0,9	2,4	0,1	95,0	25,0	70,0	5,0
VI.	„	10,05	0,569	0,457	—	—	0,112	5,7	4,6	—	—	1,1	80,2	—	—	19,8
VII.	„	12,7	0,663	—	—	—	—	5,2	—	—	—	—	—	—	—	—
VIII.	Carc. Kachexie	4,8	0,22	0,146	—	—	0,074	4,6	3,0	—	—	1,6	66,3	—	—	33,7
IX.	Puerperal Sepsis	11,1	0,822	0,565	—	—	0,257	7,8	5,3	—	—	2,5	69,0	—	—	31,0
X.	Perniziöse Anämie	6,5	0,369	0,259	—	—	0,110	5,7	4,0	—	—	1,7	70,3	—	—	29,7
XI.	Ulc. ventr. Kachexie	5,2	0,223	0,14	—	—	0,083	4,2	2,9	—	—	1,3	62,8	—	—	37,2
XII.	Eklampsie	7,5	0,126	0,085	—	—	0,041	1,7	1,1	—	—	0,6	67,6	—	—	32,3

macht, so ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß die Oxyproteïnsäuren tatsächlich ihrer Gesamtmenge nach anscheinend alle stickstoffhaltigen Bestandteile des Harns, mit Ausnahme des Harnstoffes, übertreffen.

Es ergibt sich ferner, daß die „Alloxyproteïnsäure" ihrer Menge nach hinter der Summe der beiden anderen Säuren zurückbleibt (und zwar vermutlich in noch höherem Grade, als dies aus den Versuchszahlen hervorgeht, da ihr Niederschlag einen Teil der anderen Säuren mitreißt und das Verhältnis sonach zugunsten der Alloxyproteïnsäure und zuungunsten ihrer Begleiterinnen verschoben erscheint).

Unser Resultat hinsichtlich der Menge der unter normalen Verhältnissen ausgeschiedenen Oxyproteïnsäuren steht im Einklang mit den Schätzungen von Gottlieb und Bondzyński[1]), sowie mit denjenigen Pregls[2]). Die Erstgenannten fanden 3 bis 4 g des Baryumsalzes in einem Liter Menschenharn; es wird dementsprechend 2 bis 3 Proz. des gesamten Harnstickstoffs und nach Pregl bis 4 Proz. in Form von Oxyproteïnsäuren ausgeschieden. Pfaundler[3]) fand, daß die Fraktion der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, festgebundenen Stickstoff („Aminosäurenstickstoff) enthaltenden Körper im Harn eines gesunden Mannes 4,7 Proz. des Gesamtstickstoffs entsprach. Diese Fraktion verteilt sich anscheinend in erster Linie auf Oxyproteïnsäuren und Hippursäure, wobei die Hauptmenge, wie Pfaundler mit Recht hervorhebt, auf die erstere entfällt.

Landau[4]) fand die Menge des Aminosäurenstickstoffs bei reiner Milchkost 2,1 bis 3,1 Proz., bei gemischter Kost aus Milch und Fleisch 3,0 bis 4,1 Proz. Er äußert die Meinung, daß der Anteil der Oxyproteïnsäure an dieser Fraktion nur gering sein dürfte und diese, ihrer Hauptmenge nach, aus unbekannten Substanzen bestehe, während Bondzyński[5]) betont, daß gerade die Zunahme des Aminosäurenstickstoffs in Landaus Versuchen beim Übergange von Milchkost zu gemischter Kost auf die

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.
[4]) A. Landau, Über die Stickstoffverteilung des Harns von gesunden Menschen. Gazeta Lekarska (Warschau) 38, 979, zit. nach dem Referate Bondzyńskis, Jahresber. f. Tierchemie 33, 458; vgl. auch D. Arch. f. klin. Med. 79, 416.
[5]) Vgl. Fußnote zu vorstehendem Referate.

gesteigerte Bildung der Säuren der Oxyproteïnsäuregruppe bei Fleischdiät zurückzuführen ist [1]).

Es unterliegt daher keinem Zweifel, daß ein sehr großer Anteil des „Azote non dosé“ von Donzé und Lambling (2,56 bis 8,37 Proz. des Gesamtstickstoffs) auf die Oxyproteïnsäuren zu beziehen ist. Der Reststickstoff unserer Barytfraktion entsprach für normale Menschenharne nur 0,7 bis 2,2 Proz. des Gesamtstickstoffs. Sehr groß kann sonach der Gehalt des normalen Menschenharnes an bisher gänzlich unbekannten Substanzen sicherlich nicht sein.

Die Betrachtung unserer an pathologischen Menschenharnen gewonnenen Resultate ergibt als auffallendste Tatsache die relative Konstanz des Verhältnisses zwischen Eiweißzerfall und Oxyproteïnsäurenausscheidung, derart also, daß selbst, wo (Versuch VIII, X und XI) infolge Darniederliegen des Stoffwechsels die Gesamtstickstoffausscheidung auf die Hälfte der Norm abgesunken ist, der prozentische Anteil der Oxyproteïnsäure keine auffällige Verschiebung erfahren hat. Nur bei einem Falle von Eklampsie fand sich ein abnorm niedriger Wert.

Ich möchte schließlich noch hervorheben, daß der höchste beobachtete Reststickstoffwert (2,5 Proz. des Gesamtstickstoffs) sich im Harne einer hoch fiebernden Patientin mit puerperaler Sepsis fand.

4. Hundeharn.

Versuch XIII. 1500 ccm normalen Hundeharns werden wie oben behandelt. Von 960 ccm Barytfällung werden 715 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 450 ccm gelöst.

In der Barytfraktion wird geprüft auf: a) Kynurensäure nach Jaffé: 20 ccm werden mit chlorsaurem Kali und Salzsäure eingedampft; bei Zusatz eines Tropfens Ammoniak tritt nicht die charakteristische Rotfärbung auf; b) Allantoin. 1. Die stark konzentrierte Lösung wird mit Mercurinitrat versetzt. Es fällt ein reichlicher, in Lauge löslicher Niederschlag aus, der bei längerem Stehen sich unter Quecksilberabscheidung grau färbt. 2. Fehlingsche Lösung wird erst bei anhaltendem Kochen unter Ausscheidung von rotem Kupferoxydul reduziert.

---

[1]) Von weiteren, die relative Menge des Aminosäurenstickstoffs im Menschenharn betreffenden Angaben seien noch folgende besonders erwähnt: Krüger und Schmidt (Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 556): normaler Menschenharn 5 bis 6 Proz. des Gesamtstickstoffs; Jaksch (Zeitschr. f. klin. Med. 47, 1 u. 50, 167): normaler Menschenharn 1,5 bis 3 Proz., bei Leberkrankheiten, Typhus usw. mehr; Erben (Zeitschr. f. Heilk. 25, 33): bei verschiedenen Infektionskrankheiten 3,75 bis 14,71 Proz.; Satta (Diese Beiträge 6, 368): Menschenharn bei verschiedener Ernährung 2,74 bis 8,51 Proz.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 11,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0161 g N; b) 0,5 ccm = 11,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 38 g N. (1000 ccm Harn = 32,2 g N bzw. 32,7 g N.)

Da in der Barytfraktion noch Spuren von Harnstoff und Ammoniak nachweisbar sind, werden 340 ccm der Barytfraktion noch einmal mit Alkoholäther umgefällt. Der Rückstand wird zu 355 ccm gelöst. Jetzt kein Harnstoff, kein Ammoniak nachweisbar.

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 8,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 32 g N; b) 10 ccm = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 04 g N. (1000 ccm Harn = 0,518 bzw. 0,508 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 13 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0182 g N; b) 20 ccm = 11,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0168 g N. (1000 ccm = 0,383 g N bzw. 0,353 g N.)

4. Alloxyproteïnsäure-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 7,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0102 g N; b) 20 ccm = 7,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 08 g N. (1000 ccm Harn = 0,172 g N bzw. 0,1696 g N.)

5. Harnstoff- und Ammoniak-N: 50 ccm Barytfraktion mit 25 g Metaphosphorsäure bei 150° 5 Stunden erhitzt, dann neutralisiert und mit Magnesia usta destilliert; 50 ccm = 0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3.

6. Allantoin-N (nach Loewi): 25 ccm Barytfraktion werden mit Mercuronitrat gefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff behandelt; das Filtrat mäßig alkalisch gemacht und so lange mit Silbernitrat gefällt, bis das Filtrat mit Salzsäure einen deutlichen Niederschlag gibt. Der Niederschlag wird abgesaugt und gründlich gewaschen. a) 25 ccm Barytfraktion = 1,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,002 38 g N; b) 25 ccm = 2,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 06 g N. (1000 ccm Harn = 0,0391 g N bzw. 0,052 g N.)

Versuch XIV. 1375 ccm normalen Hundeharns werden wie oben behandelt. Von 1800 ccm Barytfällung werden 1700 ccm abfiltriert. Der gut ausgewaschene, in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 500 ccm gelöst. Die Barytfraktion gibt mit Phosphorwolframsäure einen in der Hitze löslichen weißen Niederschlag. Die Furfurolreaktion fiel negativ aus.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 11,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 68 g N; b) 0,5 ccm = 11,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 66 g N. (1000 ccm Harn = 31,4 g N bzw. 33,3 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 16,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,023 52 g N; b) 10 ccm = 16,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,022 54 g N. (1000 ccm Harn = 0,905 bzw. 0,868 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 12,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,017 36 g N; b) 10 ccm = 12,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0168 g N. (1000 ccm Harn = 0,668 g N bzw. 0,646 g N.)

4. Alloxyproteïnsäure-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 7,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 06 g N; b) 25 ccm = 8,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 62 g N. (1000 ccm Harn = 0,1703 g N bzw. 0,178 g N.)

5. Allantoin-N (wie bei XIII/6): 100 ccm Barytfraktion = 11,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 38 g N. (1000 ccm Harn = 0,1175 g N.)

Versuch XV. 90 ccm normalen Hundeharns wie oben behandelt. Von 210 ccm Barytfällung werden 190 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol un-

lösliche Rückstand wird zu 160 ccm gelöst. Die Molischsche Probe und die Furfurolprobe fielen in der Barytfraktion negativ aus.

1. Gesamt-N: a) 0,4 ccm Harn = 17,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,024 78 g N; b) 0,4 ccm = 17,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0245 g N. (1000 ccm Harn = 61,9 g N bzw. 61,2 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 5 ccm Barytfraktion = 3,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 18 g N; b) 10 ccm = 7,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 64 g N. (1000 ccm Harn = 2,035 g N bzw. 2,09 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 9,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,013 72 g N; b) 20 ccm = 9,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 88 g N. (1000 ccm Harn = 1,346 g N bzw. 1,266 g N.)

4. Alloxyproteïnsäure-N: 50 ccm Barytfraktion = 6,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0091 g N. (1000 ccm Harn = 0,363 g N.)

Versuch XVI. Hunger. Derselbe Hund wie in Versuch XIII bis XV, 16 000 g schwer, hungert 3 Tage.

A. Am ersten Tage 140 ccm Harn; wie oben verarbeitet. Von 460 ccm Barytfällung werden 410 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 135 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 9,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 74 g N; b) 0,5 ccm = 9,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,013 72 g N. (1000 ccm Harn = 25,5 g N bzw. 27,4 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 4,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0063 g N; b) 10 ccm = 4,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 58 g N. (1000 ccm Harn = 0,681 g N bzw. 0,71 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 04 g N; b) 20 ccm = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 04 g N. (1000 ccm Harn = 0,651 g N bzw. 0,651 g N.)

Da der Hund am 3. und 4. Hungertage keinen Urin läßt, werden ihm 200 ccm physiologische Kochsalzlösung unter aseptischen Kautelen an verschiedenen Stellen unter die Rückenhaut infundiert.

B. Am 5. Hungertage 250 ccm Harn, wie oben verarbeitet. Von 620 ccm Barytfällung werden 510 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 250 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 12,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,017 08 g N; b) 0,5 ccm = 12,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 94 g N. (1000 ccm Harn = 34,2 g N bzw. 33,9 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 14,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,020 16 g N; b) 10 ccm = 11,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0166 g N. (1000 ccm Harn = 2,45 g N bzw. 2,01 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 15 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0210 g N; b) 20 ccm = 17,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,024 22 g N. (1000 ccm Harn = 1,276 g N bzw. 1,471 g N.)

4. Alloxyproteïnsäure-N: a) 50 ccm Barytfraktion = 11,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 54 g N; b) 50 ccm = 11,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 52 g N. (1000 ccm Harn = 0,378 g N bzw. 0,40 g N.)

C. 7. Tag: Reichliche Nahrung. Der Hund wiegt 15 500 g. 280 g Harn werden wie oben verarbeitet. Von 600 ccm Barytfällung werden

520 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 600 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 10,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 84 g N; b) 0,5 ccm = 10,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0147 g N; c) 0,5 ccm = 10,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 42 g N. (1000 ccm Harn = 29,7 g N, bzw. 29,43 g N und 28,8 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 2,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,002 94 g N; b) 20 ccm = 4,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0147 g N. (1000 ccm Harn = 0,727 g N bzw. 0,761 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 100 ccm Barytfraktion = 19,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,027 58 g N; b) 100 ccm = 18 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0252 g N. (1000 ccm Harn = 0,682 g N bzw. 0,623 g N.)

Versuch XVII. Reichliche Fleischkost. Derselbe Hund (15700 g) erhält, nachdem er sich erholt hat, reichliche Fleischkost. Von 860 ccm Barytfällung werden 680 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 230 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 0,5 ccm Harn = 16,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,023 38 g N; b) 0,5 ccm = 16,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,023 66 g N. (1000 ccm Harn = 46,8 g N bzw. 47,3 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 29,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,040 88 g N; b) 20 ccm = 28,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,040 46 g N. (1000 ccm Harn = 1,44 g N bzw. 1,44 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 26,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,037 38 g N; b) 25 ccm = 25,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0357 g N. (1000 ccm Harn = 1,05 g N bzw. 1,0 g N.)

Versuch XVIII. Hunger. Derselbe Hund (15 700 g) hungert 7 Tage.

A. Am 4. Tage, 240 ccm Harn, wie oben verarbeitet. Von 800 ccm Barytfällung werden 700 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 600 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 0,4 ccm Harn = 10,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 98 g N. (1000 ccm Harn = 37,5 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 4,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 81 g N; b) 10 ccm = 5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 g N. (1000 cm Harn = 1,96 g N bzw. 2,0 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 8,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 46 g N; b) 20 ccm = 7,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0105 g N. (1000 ccm Harn = 1,78 g N bzw. 1,5 g N.)

4. Alloxyproteïnsäure-N: a) 40 ccm Barytfraktion = 7,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 g N; b) 40 ccm = 6,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0084 g N. (1000 ccm Harn = 0,72 g N bzw. 0,6 g N.)

Da der Hund am 5. und 6. Tage keinen Urin läßt, wird ihm, wie im Versuche XVI, eine Kochsalzinfusion gemacht.

B. 7. Tag, 250 ccm Harn werden wie oben verarbeitet. Von 600 ccm Barytfällung werden 540 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 560 ccm gelöst. Der Hund wiegt 14 000 g.

1. Gesamt-N: a) 1,0 ccm Harn = 25 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,035 g N; b) 1,0 ccm = 24,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,3344 g N. (1000 ccm Harn = 35 g N bzw. 33,4 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 5,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,008 12 g N; b) 20 ccm = 5,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0008 12 g N. (1000 ccm Harn = 1,01 g N bzw. 1,01 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: 25 ccm Barytfraktion = 6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0084 g N. (1000 ccm Harn = 0,8362 g N.)

Versuch XIX. Phosphorvergiftung. Derselbe Hund, wiegt 13000 g.

A. 480 ccm Harn nach derselben Methode verarbeitet. Von 1000 ccm Barytfällung werden 900 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rest wird zu 250 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 23,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,032 48 g N; b) 1 ccm = 23,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,032 48 g N. (1000 ccm Harn = 32,5 g N bzw. 32,5 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 35,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,05 g N; b) 20 ccm = 35,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,050 26 g N. (1000 ccm Harn = 1,44 g N = bzw. 1,45 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 24,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,033 74 g N; b) 50 ccm = 46 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0564 g N. (1000 ccm Harn = 0,778 g N bzw. 0,742 g N.)

Der Hund erhält am nächsten (2.) Tage 4 ccm einer $^1/_{10}$ proz. Lösung Phosphoröl subcutan. Dasselbe am 3. Tage. Am 4. Tage erhält der Hund 10 ccm derselben Lösung.

B. Am 4. Tage werden 650 ccm Harn wie oben verarbeitet. Von 1500 ccm Barytfällung werden 1400 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 205 ccm gelöst. Im Harn kein Eiweiß durch Kochen und durch Essigsäure-Ferrocyankalium nachweisbar.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 14,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,020 44 g N; b) 1 ccm = 14,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,019 88 g N; c) 1 ccm = 14,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0203 g N. (1000 ccm Harn = 20,4 g N bzw. 19,9 g N und 20,3 g N.)

2. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: 25 ccm Barytfraktion = 34,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,048 58 g N. (1000 ccm Harn = 0,657 g N.)

Am 5. Tage erhält der Hund wieder 10 ccm einer $^1/_{10}$ proz. Phosphoröllösung.

C. Am 5. Tage. 80 ccm werden zuerst durch Aufkochen bei saurer Reaktion enteiweißt, dann wie sonst behandelt. Von 400 ccm der Barytfällung werden 380 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 105 ccm gelöst.

1. Gesamt-N nach dem Enteiweißen: a) 1 ccm Harn = 7,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 08 g N; b) 1 ccm = 7,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 64 g N. (1000 ccm Harn = 10,1 g N bzw. 10,6 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 5,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0077 g N; b) 10 ccm = 5,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 56 g N. (1000 ccm Harn = 1,065 g N bzw. 1,041 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0098 g N; b) 25 ccm = 7,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 08 g N. (1000 ccm Harn = 0,555 g N bzw. 0,558 g N.)

Am 6. Tage werden 15 ccm Phosphoröl $^1/_{10}$proz. injiziert.

D. Am 6. Tage. 640 cm Harn werden enteiweißt; nach dem Kochen sind 520 ccm vorhanden, die dann wie oben behandelt werden. Von 1010 ccm Barytfällung werden 830 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 660 ccm gelöst. In der Barytfraktion fiel die Furfurolprobe negativ aus. Phosphorwolframsäure gab einen spärlichen, in der Hitze löslichen Niederschlag.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 4,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 86 g N; b) 1 ccm = 4,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 72 g N. (1000 ccm Harn = 6,9 g N bzw. 6,7 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 76 g N; b) 10 ccm = 3,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 04 g N. (1000 ccm Harn = 0,735 g N bzw. 0,7784 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 4,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0063 g N; b) 25 ccm = 4,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 88 g N. (1000 ccm Harn = 0,399 g N bzw. 0,3633 g N.)

4. Ammoniak- und Harnstoff-N: 50 ccm Barytfraktion werden bei 150° 5 Stunden mit 25 g Metaphosphorsäure erhitzt. Dann wird mit Natronlauge vorsichtig neutralisiert und mit Magnesia usta destilliert. 50 ccm = 0,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,001 26 g N. (1000 ccm Harn = 0,038 g, d. i. 10 Proz. des Oxyproteïnsäuren-N.) Am nächsten Tage starb der Hund.

Versuch XX. Normal. Hund B, 11 000 g schwer. 115 ccm normaler Harn werden wie gewöhnlich verarbeitet. Von 500 ccm Barytfällung werden 475 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 310 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 35,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,049 28 g N; b) 1 ccm = 35,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,049 84 g N. (1000 ccm Harn = 49,3 g N bzw. 49,8 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 32 g N; b) 10 ccm = 3,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 28 g N. (1000 ccm Harn = 1,51 g N bzw. 1,46 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 50 ccm Barytfraktion = 12,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,017 36 g N; b) 50 ccm = 11,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 96 g N. (1000 ccm Harn = 0,985 g N bzw. 0,906 g N.)

Versuch XXI. Normal. 440 ccm normalen Hundeharns (derselbe Hund wie im vorigen Versuch) werden wie oben verarbeitet. Von 1100 ccm Barytfällung werden 1000 ccm filtriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 200 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 24 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0336 g N; b) 1 ccm = 23,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0329 g N. (1000 ccm Harn = 33,6 g N bzw. 32,9 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 11,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 82 g N; b) 10 ccm = 11,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 52 g N. (1000 ccm Harn = 0,791 g N bzw. 0,826 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 20,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,028 14 g N; b) 20 ccm = 19,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,027 86 g N (1000 ccm Harn = 0,7035 g N bzw. 0,6965 g N).

Versuch XXII. Hunger und Phlorizindiabetes. Nach 5 Tagen Hungers werden dem Hunde, der zu den beiden vorigen Versuchen gedient hat, 20 ccm einer 3 proz. Lösung von Phlorizin in 1 proz. Natriumcarbonatlösung injiziert.

A. 6. Tag. 300 ccm alkalischen Harns, der stark zuckerhaltig, aber nicht eiweißhaltig ist, werden wie oben verarbeitet. Von 1200 ccm Barytfällung werden 1000 ccm filtriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 400 ccm gelöst. Die Barytfraktion gibt nicht die Molischsche oder die Fehlingsche Reaktion.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 11 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0154 g N; b) 1 ccm = 11,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 54 g N. (1000 ccm Harn = 15,4 g N bzw. 15,5 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N; b) 10 ccm = 2,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 06 g N. (1000 ccm Harn = 0,77 g N bzw. 0,74 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 3,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 48 g N; b) 50 ccm = 6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0084 g N; c) 50 ccm = 6,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,008 54 g N. (1000 ccm Harn = 0,29 g N bzw. 0,27 g N und 0,276 g N.)

Am 7. Tage werden dem Hunde wieder 20 ccm derselben Lösung injiziert.

B. 9. Tag. 125 ccm Harn werden wie oben verarbeitet. Von 540 ccm Barytfällung werden 450 ccm filtriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 125 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 19 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0266 g N; b) 1 ccm = 19,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,027 86 g N. (1000 ccm Harn = 26,6 g N bzw. 27,9 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 3,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N; b) 10 ccm = 3,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,004 34 g N. (1000 ccm Harn = 0,504 g N bzw. 0,521 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 5,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 28 g N; b) 25 ccm = 5,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,008 12 g N. (1000 ccm Harn = 0,349 g N bzw. 0,3898 g N.)

Versuch XXIII. Normal. Hund C, 15 500 g, 270 ccm normalen Hundeharns wie oben verarbeitet. Von 500 ccm Barytfällung werden 450 ccm filtriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 175 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 20,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,029 26 g N; b) 1 ccm = 21,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,029 68 g N. (1000 ccm Harn = 29,3 g N bzw. 29,7 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 8,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 04 g N; b) 10 ccm = 8,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 62 g N. (1000 ccm = 0,867 g N bzw. 0,837 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 25 ccm Barytfraktion = 16,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0231 g N; b) 25 ccm = 14,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0203 g N. (1000 ccm Harn = 0,665 g N bzw. 0,584 g N.)

Versuch XXIV. Hunger und Phlorizindiabetes. Am 5. Hungertage werden dem Hunde C 20 ccm einer 3 proz. Phlorizinlösung subcutan injiziert.

Am 7. Tage werden 395 ccm Harn wie gewöhnlich verarbeitet. Von 900 ccm Barytfällung werden 810 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 500 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 14,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,020 16 g N; b) 1 ccm = 14,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0203 g N. (1000 ccm Harn = 20,2 g N bzw. 20,3 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 4,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 72 g N; b) 20 ccm = 5,1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 14 g N. (1000 ccm Harn = 0,473 g N bzw. 0,502 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 50 ccm Barytfraktion = 10,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 26 g N; b) 50 ccm = 10,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,014 98 g N. (1000 ccm Harn = 0,429 g N bzw. 0,421 g N.)

Versuch XXV. Hunger. Am 15. Hungertage ist die Phlorizinwirkung bereits abgeklungen. Es werden 125 ccm Harn wie oben verarbeitet. Von 700 ccm Barytfällung werden 460 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche, gut ausgewaschene Rückstand wird zu 80 ccm gelöst. Die Barytfraktion trübt sich auf Phosphorwolframsäurezusatz bei saurer Reaktion; die minimale Trübung verschwindet beim Kochen. Furfurolreaktion negativ.

1. Gesamt-N: a) 2 ccm Harn = 52,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,073 08 g N; b) 2 ccm = 52,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0728 g N. (1000 ccm Harn = 36,5 g N bzw. 36,4 g N.)

2. Barytfraktion-N: 5 ccm Barytfraktion = 5,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 56 g N. (1000 ccm Harn = 1,48 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 17,7 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,024 78 g N; b) 14 ccm = 11,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0154 g N. (1000 ccm Harn = 1,211 g N bzw. 1,072 g N.)

4. Ammoniak- und Harnstoff-N: 20 ccm Barytfraktion werden mit 10 g Metaphosphorsäure bei 150° 5 Stunden gekocht, dann neutralisiert und mit Magnesia usta destilliert. 20 ccm = 8,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 62 g N. (1000 ccm Harn = 0,565 g N.)

Da die qualitativen Proben auf Harnstoff und Ammoniak negativ ausfielen, treten während der Periode der prämortalen Stickstoffsteigerung anscheinend andere Substanzen auf, die ihren Stickstoff beim Kochen mit Metaphosphorsäure abgeben. Nach Abzug dieses Wertes bleiben wieder nur 1,6 Proz. Oxyproteïnsäurestickstoff.

Versuch XXVI. Normal. 350 ccm normalen Hundeharns werden wie oben verarbeitet. Von 1460 ccm Barytfällung werden 1200 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 500 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 1 ccm Harn = 17,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0245 g N; b) 1 ccm = 17,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,02492 g N. (1000 ccm Harn = 24,5 g N bzw. 24,9 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 3,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N; b) 50 ccm = 7,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,011 06 g N. (1000 ccm Harn = 0,365 g N bzw. 0,377 g N.)

3. Harnstoff- und Ammoniak-N: 50 ccm Barytfraktion mit 25 g Metaphosphorsäure 5 Stunden lang bei 150° erhitzt, dann neutralisiert und

mit Magnesia usta destilliert. 50 ccm = 0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3; b) 100 ccm Barytfraktion werden eingeengt und mit Ätheralkohol umgefällt. Der Ätheralkohol wird filtriert, abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und auf Harnstoff geprüft; die Furfurolprobe fiel negativ aus.

Überblicken wir die in umstehender Tabelle zusammengestellten Versuche, so ersehen wir folgendes:

In einem Liter normalen Hundeharns fand sich, einem Gesamtstickstoffgehalt von 29,5 bis 61,5 g entsprechend, 0,36 bis 1,31 g Oxyproteïnsäurestickstoff. Von der gesamten Stickstoffmenge entfielen 1,1 bis 2,1 Proz. auf die Oxyproteïnsäuren. Die prozentische Menge dieser letzteren im Hundeharn bleibt also hinter derjenigen des Menschenharns (3,1 bis 5,0 Proz.) erheblich zurück, während die absolute Menge in der Volumeinheit, entsprechend der viel größeren Konzentration des Hundeharns, größer ist. Auch hier steht wiederum die Alloxyproteïnsäure ihrer Menge nach hinter der Summe der beiden anderen Säuren zurück.

Der Reststickstoff, d. h. jener Anteil des Stickstoffs der „Barytfraktion", welcher nicht den Oxyproteïnsäuren angehört, beträgt hier 0,3 bis 2,1 Proz. des Gesamtstickstoffs (Menschenharn 0,7 bis 2,2 Proz.). Also auch hier dürfte für stickstoffhaltige Substanzen unbekannter Art kein allzuweiter Raum übrig bleiben.

Nach Bondzyński und Gottlieb [1]) scheidet ein normaler Hund nach Fleischfütterung etwa 2,5 Proz. des Stickstoffs in Form von Oxyproteïnsäuren aus. Pfaundler [2]) fand für einen solchen Hund die „Aminosäurefraktion", also den durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren, fest gebundenen Stickstoff = 2,26 bzw. 4,33 Proz. vom Gesamtstickstoff, und auch hier wird man annehmen dürfen, daß die anderen Bestandteile dieser Fraktion (Hippursäure, Aminosäure u. dgl.) ihrer Menge nach hinter den Oxyproteïnsäuren zurückbleiben.

Das Verhältnis zwischen Oxyproteïnsäure-N und Gesamt-N, also mit anderen Worten die Beziehung zwischen der Ausscheidung dieser Säuren und dem Eiweißzerfall ist beim Hunde unter normalen Verhältnissen außerordentlich konstant.

Hund A: (Vers. XIV) 2,0 Proz., (Vers. XV) 2,1 Proz., (Vers. XVII) 2,1 Proz., (Vers. XIX) 2,3 Proz. des Gesamtstickstoffs.

Hund B: Vers. (XX) 2,0 Proz., (Vers. XXI) 2,1 Proz.

Hund C: (Vers. XXIII) 2,1 Proz.

---

[1]) l. c.

[2]) l. c.

Zusammenstellung der Versuche mit Hundeharn.

Versuchs-Nummer	Art	In einem Liter Harn: Gesamt-N g	Baryt-N g	Oxyproteïns.-N: Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N g	Alloxyproteïnsäure-N g	Antoxyproteïnsäure-N + Oxyproteïnsäure-N g	Rest-N g	Gesamt-N: Baryt-N Proz.	Oxyproteïns.-N: Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N Proz.	Alloxyproteïnsäure-N Proz.	Antoxyproteïnsäure-N + Oxyproteïnsäure-N Proz.	Rest-N Proz.
	Vermischter Harn mehrerer Hunde.											
XIII.	Normal	32,5	0,513	0,368	0,170	0,198	0,145	1,6	1,1	0,5	0,6	0,5
	Hund A.											
XIV.	Normal	32,3	0,886	0,657	0,174	0,483	0,229	2,7	2,0	0,5	1,5	0,7
XV.	„	61,5	2,062	1,306	0,363	0,943	0,756	3,3	2,1	0,6	1,5	1,2
XVI.	Hunger											
	a) 1. Tag	26,5	0,695	0,651	—	—	0,036	2,6	2,4	—	—	0,2
	b) 5. Tag	34,0	2,23	1,373	0,389	0,984	0,857	6,5	4,0	1,1	2,9	2,5
	c) 7. Freßtag	29,3	0,744	0,652	—	—	0,092	2,5	2,3	—	—	0,2
XVII.	Reichliche Fleischkost	47,0	1,44	1,025	—	—	0,415	3,0	2,1	—	—	0,9
XVIII.	Hunger											
	a) 4. Tag	37,5	1,98	1,64	0,66	0,98	0,340	5,3	4,4	—	—	0,9
	b) 7. Tag	34,7	1,01	0,836	—	—	0,174	2,9	2,4	—	—	0,5
XIX.	Phosphorvergiftung											
	a) vor der Vergiftung	32,5	1,44	0,760	—	—	0,68	4,4	2,3	—	—	2,1
	b) 4. Tag	20,0	—	0,657	—	—	—	—	3,2	—	—	—
	c) 5. Tag	10,4	1,053	0,557	—	—	0,496	10,1	5,3	—	—	4,8
	d) 6. Tag	6,8	0,756	0,381	—	—	0,375	11,1	5,6	—	—	5,5
	Hund B.											
XX.	Normal	49,5	1,485	0,945	—	—	0,540	3,0	2,0	—	—	1,0
XXI.	„	33,2	0,806	0,700	—	—	0,106	2,4	2,1	—	—	0,3
XXII.	Hunger u. Phlorizin											
	a) 6. Tag	15,4	0,755	0,279	—	—	0,476	4,9	1,8	—	—	3,1
	b) 8. Tag	27,2	0,512	0,369	—	—	0,143	1,9	1,3	—	—	0,6
	Hund C.											
XXIII.	Normal	29,5	0,852	0,625	—	—	0,227	2,8	2,1	—	—	0,7
XXIV.	Hunger u. Phlorizin 7. Tag	20,2	0,485	0,427	—	—	0,058	2,4	2,1	—	—	0,3
XXV.	Hunger 15. Tag	36,5	1,480	0,575	—	—	0,340 (+ 0,565)	4,0	1,6	—	—	0,9 (+ 1,5)

Diesen übereinstimmenden Zahlen gegenüber wird der erste unserer Hundeversuche (Versuch XIII) mit gemischtem Hundeharn unbekannter Provenienz, der eine viel niedrigere Zahl (1,1 Proz.) ergab, kaum ins Gewicht fallen können, und man wird einen Wert von rund 2 Proz. als Normalzahl für den Anteil der Oxyproteïnsäuren an der Stickstoffausscheidung des normalen Hundes ansehen dürfen.

Auch im Hunger, der in zwei Versuchen mit Phlorizinvergiftung kombiniert wurde, zeigte dieses Verhältnis keine regelmäßige Verschiebung. Der eine unserer Hunde reagierte allerdings zweimal im Beginn einer Hungerperiode mit einem Anstieg der Prozentzahl des Oxyproteïnsäurestickstoffs:

Hund A

α (Vers. XVI):		β (Vers. XVIII):	
Normal	2,1 Proz.	Normal	2,1 Proz.
1. Hungertag . . .	2,4 „	4. Hungertag . . .	4,4 „
5. „ . . .	4,0 „	7. „ . . .	2,4 „
7. „ . . .	2,3 „		

Doch glich sich diese Differenz bei längerer Dauer des Hungerversuches wieder aus und war bei den beiden anderen Hunden überhaupt nicht zu beobachten.

Hund B (Vers. XXII):		Hund C (Vers. XXIV, XXV):	
Normal	2,1 Proz.	Normal	2,1 Proz.
Hunger u. Phlorizin, 6. Tag	1,8 „	Hunger u. Phlorizin, 7. Tag	2,1 „
„ „ „ 8. „	1,3 „	Hunger, 15. Tag	1,6 „

Der letztgenannte Versuch gab übrigens insofern ein anormales Bild, als die Barytfraktion in diesem Falle, wie der Kontrollversuch lehrte, eine erhebliche Menge durch die Phosphorsäurehydrolyse bei 150° als Ammoniak abspaltbaren Stickstoffs enthielt. Gegen die nächstliegende Annahme einer infolge ungenügender Reinigung zurückgebliebenen Beimengung von Harnstoff spricht, abgesehen von der Versuchstechnik, der negative Ausfall der Furfurolreaktion (deren Empfindlichkeit den Nachweis weit geringerer Harnstoffmengen, als hier vorgelegen haben müßten, gestattet), gegen eine Verunreinigung mit Ammoniumsalzen der Umstand, daß Phosphorwolframsäure nur eine minimale, beim Kochen verschwindende Trübung erzeugt. Anscheinend ist also in dieser vorgeschrittenen Hungerperiode (15. Hungertag), vielleicht dem prämortalen Stickstoffanstiege entsprechend, ein abnormer, locker gebundenen Stickstoff enthaltender Harnbestandteil aufgetreten, der sich der Barytfraktion beigemengt hat.

Sehr charakteristisch war das Verhalten des Harns bei der Phosphorvergiftung. Vom Beginne der Vergiftung bis zum Tode war ein allmählicher, relativer Anstieg sowohl des Oxyproteïnsäurenstickstoffs als auch des Reststickstoffs bis auf nahezu das Dreifache des Normalwertes zu beobachten:

	Oxyproteïnsäuren-N	Rest-N
Normal	2,3 Proz.	2,1 Proz. des Gesamtstickstoffs
4. Tag der Vergiftung	3,2 „	—
5. „ „ „	5,3 „	4,8 „ „ „
6. „ „ „	5,6 „	5,5 „ „ „

Hinsichtlich der Oxyproteïnsäuren haben bereits, wie erwähnt, Bondzyński und Gottlieb eine Vermehrung derselben bei der Phosphorvergiftung erwähnt.

Ob es sich allerdings auch um eine absolute Vermehrung der Tagesausscheidung der Oxyproteïnsäuren handelt, könnte nur durch eine quantitative Untersuchung des gesamten Tagesharns entschieden werden, auf welche wir aus versuchstechnischen Gründen leider verzichten mußten. Der niedrige Stickstoffgehalt der Harne unseres Hundes in den letzten Stadien der Phosphorvergiftung berechtigt zu Zweifel in dieser Hinsicht. Die Möglichkeit einer Verunreinigung der Fraktionen mit Harnstoff und Ammoniak ist hier durch einen quantitativen Hydrolysenversuch mit Phosphorsäure ausgeschlossen worden.

Anhang.

Versuch XXVII. Pferdeharn. 500 ccm normalen Pferdeharns nach der Methode B verarbeitet. Von 1150 ccm Barytfällung werden 1000 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 350 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 86 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,1204 g N; a) 1,0 ccm = 16,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,023 52 g N. (1000 ccm Harn = 24 g N bzw. 23,5 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 7,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 92 g N; b) 10 ccm = 7,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,010 08 g N. (1000 ccm Harn = 0,879 g N bzw. 0,8115 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: 20 ccm Barytfraktion = 8,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,012 32 g N. (1000 ccm Harn = 0,496 g N.)

Versuch XXVIII. Kaninchenharn. 130 ccm normalen Kaninchenharns werden wie oben verarbeitet. Von 400 ccm Barytfällung werden 380 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 60 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 12,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,017 64 g N; b) 5 ccm = 13,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,019 32 g N. (1000 ccm Harn = 3,53 g N bzw. 3,86 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 5 ccm Barytfraktion = 1,3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,001 82 g N; b) 5 ccm = 1,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0021 g N. (1000 ccm Harn = 0,176 g N bzw. 0,201 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: Bestimmung wegen der geringen Menge des Niederschlages nicht durchführbar.

Versuch XXIX. Kaninchenharn. 205 ccm normalen Kaninchenharns wie oben verarbeitet. Von 600 ccm Barytfällung werden 540 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rest wird zu 300 ccm gelöst.

1. Gesamt-N: a) 5 ccm Harn = 11,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0154 g N; b) 5 ccm = 11,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 68 g N. (1000 ccm Harn = 3,08 g N bzw. 3,13 g N.)

2. Barytfraktion-N: a) 20 ccm Barytfraktion = 2,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0028 g N; b) 20 ccm = 2,0 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0028 g N. (1000 ccm Harn = 0,227 g N bzw. 0,227 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: Aus demselben Grunde wie oben nicht quantitativ bestimmt.

Versuch XXX. Gänseharn. Einer Gans wird der Mastdarm dicht an der Kloake unter streng aseptischen Kautelen und unter Vermeidung der Ureteren unterbunden. Das Tier bekommt reichlich Wasser und wenig Körnerfutter, zugleich jedoch zur Aufhebung der Peristaltik 0,003 g Extr. opii. Als Käfig dient ein sehr geräumiges Präparatenglas, das oben durch ein weites Drahtgeflecht verschlossen wird. Nachdem der in der Kloake befindliche Kot abgegangen ist, wird die Gans in den Käfig gesetzt. Nach 2 Tagen wird das Tier aus dem Gefäß genommen und die am Boden befindliche Masse und Flüssigkeit mit Wasser herausgespült und abgesaugt. Der größtenteils aus Harnsäure bestehende Niederschlag wird in Natronlauge gelöst, mit Salzsäure wieder ausgefällt, auf dem Saugfilter ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Das Filtrat, das 1740 ccm beträgt, wird eingeengt und dann wie gewöhnlich behandelt. Von 740 ccm Barytfällung werden 550 ccm abfiltriert. Der in Ätheralkohol unlösliche Rückstand wird zu 220 ccm gelöst.

1. α) Harnsäure gewogen: 4,072 g $C_5H_4N_4O_3$ = 1,357 g N; β) Gesamt-N des Filtrats = 0,457 g N; a) 20 ccm = 3,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 04 g N; b) 20 ccm = 3,9 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,005 46 g N. (1740 ccm des Filtrats = 0,4385 g N bzw. 0,475 g N.) Gesamt-N des Gänseharns = 1,814 g N.

2. Barytfraktion-N: a) 10 ccm Barytfraktion = 1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0014 g N; b) 10 ccm = 1 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0014 g N. (1740 ccm Filtrat = 0,041 44 g N bzw. 0,041 44 g N.)

3. Gesamt-Oxyproteïnsäuren-N: a) 75 ccm Barytfraktion = 5,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,007 28 g N; b) 75 ccm = 4,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,006 72 g N. (1740 ccm Filtrat = 0,0287 g N bzw. 0,0265 g N.)

Zusammenfassung der Versuche XXVII bis XXX.

Versuchs-Nr.	Art	Gesamt-N g	Baryt-N g	Oxyproteïns.-N g	Rest-N g	Gesamt-N: Baryt-N Proz.	Gesamt-N: Oxyproteïns.-N Proz.	Gesamt-N: Rest-N Proz.
XXVII.	Pferd	23,8	0,845	0,496	0,349	3,5	2,1	1,4
XXVIII.	Kaninchen	3,7	0,189	?	?	5,1	?	?
XXIX.	„	3,1	0,227	?	?	7,4	?	?
XXX.	Gans	1,81	0,0414	0,0276	0,013	2,8	1,5	1,3

Die Harnfraktion der Substanzen der Oxyproteïnsäurengruppe kommt demnach im Pferde- und Gänseharn ungefähr in derselben relativen Menge vor wie im Hundeharn; auch für den Stoffwechsel des Kaninchens scheint im Hinblick auf die Größe der Barytfraktion der Oxyproteïnsäuregruppe dieselbe Bedeutung zuzukommen, wenn dies auch infolge Materialmangels nicht streng bewiesen wurde.

5. Versuche zur Charakteristik der Substanzen der Oxyproteïnsäuregruppe.

Unsere nächste Aufgabe war es nunmehr, durch einige orientierende Versuche einer Aufklärung der chemischen Stellung der Substanzen der Oxyproteïnsäuregruppe näher zu kommen.

I. Dialysierbarkeit.

1. 50 ccm Barytfraktion von Versuch II (normaler Menschenharn) werden im Pergamentschlauch 8 Tage lang gegen destilliertes Wasser, das öfters gewechselt wird, dialysiert. 50 ccm = 2,6 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,003 64 g N. Es sind also von den in 50 ccm Barytfraktion enthaltenen 0,014 g N 0,010 36 g dialysiert, d. i. 74 Proz.

2. 50 ccm der Barytfraktion von Versuch III (normaler Menschenharn) werden 5 Tage gegen destilliertes Wasser dialysiert und dann der Stickstoff des Schlauchinhalts nach Kjeldahl bestimmt. 50 ccm = 3 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0042 g N.

In 50 ccm der Flüssigkeit vor der Dialyse . . .	0,0528 g N
„ 50 „ „ „ nach der Dialyse . .	0,0042 „ „
Differenz . . .	0,0486 g N

d. i. es sind in 5 Tagen von 0,0528 g N 0,0486 g N dialysiert, d. i. 92 Proz.

3. 5 ccm einer konzentrierten Lösung von Oxyproteïnsäuren von bekanntem N-Gehalt werden 4 Tage lang bei täglichem Wasserwechsel gegen destilliertes Wasser dialysiert.

a) N-Gehalt der Lösung: 1 ccm = 11,8 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,016 52 g N; b) 1 ccm = 11,2 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,015 68 g N; c) 1 ccm = 11,5 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,0161 g N. (100 ccm = 1,65 g N bzw. 1,57 g N und 1,61 g N.) 100 ccm Barytfraktion = 1,61 g N (Mittelwert).

b) N-Gehalt nach der Dialyse: 5 ccm = 1,4 ccm $^1/_{10}$ n-NH_3 = 0,001 96 g N. (100 ccm Barytfraktion = 0,039 g N, d. i. 2,4 Proz. des Gesamt-N.) Die dialysierte Menge betrug sonach 97,6 Proz.

4. Ein weiterer Versuch wurde mit der Reststickstofffraktion ausgeführt, indem eine Barytfraktion (Versuch XXI) mit Quecksilberacetat unter Sodazusatz gefällt und das Filtrat nach Ermittelung seines Stickstoffgehaltes der Dialyse unterworfen wurde. Nach fünftägiger Dialyse waren 95 Proz., im Parallelversuch 74 Proz. des Stickstoffs heraus diffundiert.

Die Oxyproteïnsäuren gehören sonach keineswegs zu den sehr schwer diffundierenden Substanzen und müssen sonach von der

adialysablen Harnfraktion, welche kürzlich von Sasaki[1]) und Savaré[2]) quantitativ untersucht worden ist, wohl unterschieden werden.

Dagegen ist es nicht unwahrscheinlich, daß jene Harnfraktion, welche Abderhalden und Pregl[3]) durch mehrtägige Dialyse des Alkoholextraktes aus einer großen Harnmenge erhalten haben, zum Teil aus Oxyproteïnsäuren bestanden hat. Denn wenn es z. B. einerseits unschwer gelingen wird, die Dialysierbarkeit von Peptonlösungen bei Versuchen mit kleinen Quantitäten derselben zu demonstrieren, so wird man doch, wenn man etwa eine große Peptonmenge mit einem Vielfachen ihrer Gewichtsmenge von Harnstoff und Harnsalzen mengt und dialysiert, nach kurzer Zeit einen seiner Hauptmenge nach aus Peptonen bestehenden Rückstand im Dialysierschlauch vorfinden, da ja die Peptone immerhin viel langsamer diffundieren als ihre Begleiter. Eine analoge Betrachtungsweise dürfte auch für die Oxyproteïnsäuren gelten.

II. Hydrolytische Spaltung.

Schon mit Rücksicht auf den oben erwähnten Versuch von Abderhalden und Pregl, die bei der hydrolytischen Spaltung der schwer dialysablen Harnfraktion, wie bereits früher erwähnt, eine Reihe von Aminosäuren erhalten hatten, mußte der Versuch angestellt werden, ob auch die isolierten Oxyproteïnsäuren bei der Säurehydrolyse Eiweißabbauprodukte liefern.

Zu diesem Zwecke wurde eine größere Harnfraktion (etwa 15 Liter) im Vakuum bei 50° zum Sirup gedampft, dieser sodann nach der Methode B (S. 417) auf Oxyproteïnsäuren weiter verarbeitet. Der durch Quecksilberacetat unter Sodazusatz aus der Barytfraktion gefällte Niederschlag wurde auf dem Saugfilter mit Wasser ausgewaschen, sodann durch mehrstündiges Kochen mit 20proz. Salzsäure nach Zusatz von Zinnchlorür (zur Vermeidung der Melaninbildung) gespalten, die Flüssigkeit durch Eindampfen im Vakuum von der Hauptmenge der Salzsäure befreit, der Rückstand in Wasser aufgenommen und durch frisch gefälltes Silberoxyd von der Salzsäure gereinigt, das Chlorsilberfiltrat durch Schwefelwasserstoff von den Schwermetallen befreit und eingedampft. Aus dem wasserhellen neutralen Filtrat schied sich beim Einengen eine Kristallkruste ab, die, von der Mutterlauge abgetrennt und aus

[1]) l. c.
[2]) l. c.
[3]) l. c.

verdünntem Ammoniak umkristallisiert, sich durch die typische Form der Kristalldrusen (Kugeln, aus radiär gestellten feinen Blättchen zusammengesetzt), die Lösungsverhältnisse, sowie das Verhalten beim Erhitzen (weißes Sublimat, Amylamingeruch) als Leucin erkennen ließ.

Bei einem weiteren Versuche wurde, Bezug nehmend auf die Angaben Liebermanns [1]), festgestellt, daß in der hydrolysierten Oxyproteïnsäurefraktion keine Schwefelsäure nachweisbar war, daß dieselbe sonach in unserem Falle keine Ätherschwefelsäure enthalten hatte.

III. Diazoreaktion.

Bondzyński und seine Mitarbeiter haben gezeigt, daß die Antoxyproteïnsäure den beiden anderen Oxyproteïnsäuren gegenüber durch ihre intensive Diazoreaktion (nach Ehrlich) ausgezeichnet ist. Wir legten uns nun die Frage vor, ob denn die typische Diazoreaktion des Harns auf einen abnorm vermehrten Gehalt von Antoxyproteïnsäure bezogen werden dürfe.

Ich möchte hier auf die außerordentlich umfangreiche Literatur über die Diazoreaktion des Harnes nicht näher eingehen und begnüge mich, in dieser Hinsicht auf die vortreffliche Zusammenstellung von E. Zunz [2]) zu verweisen.

Ich will nur hervorheben, daß, wie ich mich überzeugt habe, die drei für die Diazoreaktion in Betracht kommenden Reagenzien ein durchaus verschiedenes Verhalten zeigen. Es sind dies 1. das Ehrlichsche Reagens (Sulfanilsäure); 2. das Friedenwaldsche Reagens (Paramidoacetophenon) und 3. das Penzoldtsche Reagens (kristallisierte Diazobenzolsulfosäure [3]).

Die Prüfung des Verhaltens der drei Oxyproteïnsäuren gegenüber diesen Reagenzien ergab folgendes:

	Reaktion nach		
	Ehrlich	Friedenwald	Penzoldt
Antoxyproteïnsäure	+	+	+
Oxyproteïnsäure	—	—	+
Alloxyproteïnsäure	—	—	+

[1]) l. c.

[2]) Edgar Zunz, La Diazo-Réaction d'Ehrlich I, Bulletin de l'Acad. Royale de méd. de Belgique 1900; II, ebenda 1902.

[3]) Hinsichtlich Herstellung der Reagenzien und Ausführung der Reaktionen vgl. die Angaben in der Abhandlung von Zunz, sowie die Originalmitteilungen der Autoren.

Ferner die Untersuchung einiger Vergleichsobjekte:

	Proz.	Ehrlich	Friedenwald	Penzoldt
Traubenzucker	2	—	—	+
Maltose	1	—	—	+ beim Kochen
Mannit	1	—	—	"
Lösliche Stärke	—	—	—	"
Harnstoff	—	—	—	—
Caseïn (Hammarsten)	—	—	+	+
Pepton	5	—	+	+ sofort
"	0,5	—	+	+
Protalbumose	5	—	+	+
Heteroalbumose	5	—	+	+
Deuteroalbumose A . .	5	—	+	+
" C . .	5	—	+	+
Tyrosin	0,5	—	+	+
"	0,2	—	+	+
Phenylalanin	—	—	—	—

Es kann also, wie ein Blick auf die Tabellen lehrt, nur die Ehrlichsche Reaktion als charakteristisch gelten; die Friedenwaldsche Reaktion kommt auch den Eiweißkörpern und eiweißartigen Substanzen, die Penzoldtsche überdies den Kohlehydraten zu. Die Ehrlichsche Reaktion bei richtiger Ausführung gelang mir aber nur mit Antoxyproteïnsäure und mit „Diazoharnen“.

Man könnte sich also sicherlich versucht fühlen, die klinische Diazoreaktion auf einen vermehrten Gehalt des Harnes an Antoxyproteïnsäure zurückzuführen, wenn einer solchen Auffassung nicht Bedenken entgegenstehen würden.

Das eine derselben bezieht sich auf die Fällungsverhältnisse. Das Chromogen der Diazoreaktion ist nach den übereinstimmenden Angaben von Ehrlich[1]), Brieger und Clemens[2]) durch Bleiessig, nach Brieger[3]) sogar durch neutrales Bleiacetat aus dem Harn fällbar. Die Antoxyproteïnsäure ist dagegen weder durch neutrales noch durch basisches Bleiacetat fällbar; allerdings kann etwas von derselben durch einen Bleiniederschlag mechanisch niedergerissen werden.

---

[1]) Ehrlich und Brieger, Verhandlungen des Vereins für innere Medizin. Berlin, 16. Juni 1884. Deutsch. med. Wochenschr. 1884, S. 1430.

[2]) Clemens, Verhandlungen des Kongresses für innere Medizin 1904, S. 458.

[3]) Brieger, Medizinische Woche 1900, S. 6.

Das andere Bedenken gilt der von zahlreichen Autoren hervorgehobenen Labilität der klinischen Diazoreaktion. Ich habe mich auch selbst gelegentlich davon überzeugt, daß z. B. Harne von Tuberkulösen, die unmittelbar nach der Entleerung die schönste Diazoreaktion zeigten, dieselbe bereits innerhalb weniger Stunden eingebüßt hatten. Für eine besondere Labilität der Antoxyproteïnsäure liegt aber keinerlei Anhaltspunkt vor, es wäre denn, daß man an intramolekuläre Umlagerungen derselben, die sich den sonstigen Wahrnehmungen entziehen, denken wollte.

Wir halten uns daher heute noch nicht für berechtigt, die klinische Diazoreaktion ohne weiteres zu der Antoxyproteïnsäure in Beziehung zu bringen.

IV. Fragen wir uns nunmehr zum Schlusse, indem wir die Gesamtheit der über die Oxyproteïnsäuren vorliegenden Erfahrungen überblicken, welche physiologische und chemische Stellung den Substanzen dieser Gruppe zukommen dürfte, so ergibt sich folgendes:

Trotzdem die Oxyproteïnsäuren durch keine eigentlichen Eiweißreaktionen gekennzeichnet sind, wird man doch nicht fehlgehen, wenn man sie als Eiweißabbauprodukte ansieht. Diese bereits von früheren Autoren ausgesprochene Anschauung wird durch den Nachweis, daß ihr Auftreten im Harn mit dem Eiweißzerfall parallel geht und daß bei ihrer hydrolytischen Spaltung Aminosäuren auftreten, gestützt. Wahrscheinlich ist nicht nur das von uns direkt nachgewiesene Leucin, sondern auch das Gemenge von Aminosäuren, das Abderhalden und Pregl[1]) durch Hydrolyse der schwer dialysablen, alkohollöslichen Harnfraktion erhalten haben, wenigstens zum Teil auf diese Quelle zurückzuführen. Das eingehende Studium dieser Verhältnisse muß Gegenstand weiterer, mit größeren Mengen Ausgangsmaterials durchzuführender Versuche sein. Erst nach Gewinnung eines tieferen Einblickes in die hier vorliegenden Verhältnisse wird ein bestimmtes Urteil darüber möglich sein, ob wir es hier mit einem oder mehreren wohldefinierten Komplexen von konstanter Zusammensetzung zu tun haben, die bestimmten, im Stoffwechsel schwer angreifbaren Gruppen des Eiweißmoleküls entsprechen, oder ob es sich etwa um variable Gemenge von Polypeptiden handelt, denen nur gewisse Gruppenreaktionen (Fällbarkeit durch Mercurisalze, Löslichkeit der Barytsalze in Wasser, Unlöslichkeit in Alkohol) gemeinsam sind und die je nach

[1]) l. c.

Individualität und physiologischen Begleitumständen stetig wechselnde, der Verbrennung entgangene Bruchstücke des Eiweißmoleküls darstellen.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung jener Stickstofffraktion des Harns ausgearbeitet, welche die Gruppe der Oxyproteïnsäuren umfaßt, d. i. jener Substanzen von saurem Charakter, welche durch Quecksilberacetat fällbar sind und in Wasser lösliche, in Alkohol unlösliche Barytsalze geben.

2. In den untersuchten normalen Menschenharnen entfielen 3,1 bis 5,0 Proz. des Gesamtstickstoffs auf die Oxyproteïnsäurefraktion. Die Summe der Substanzen dieser Gruppe überwiegt ihrer Menge nach (der ungefähren Schätzung nach etwa $1^1/_2$ bis $3^1/_2$ g im Liter) die Menge sämtlicher anderer stickstoffhaltiger organischer Harnbestandteile, mit Ausnahme des Harnstoffs.

3. Auch unter pathologischen Verhältnissen hielt sich der in Form von Oxyproteïnsäuren ausgeschiedene Stickstoffanteil annähernd innerhalb derselben Grenzen und erfuhr selbst bei beträchtlicher Herabminderung der Gesamtstickstoffausscheidung keine auffallende Verschiebung.

4. Ein noch konstanteres Verhältnis fand sich beim Hunde, wo unabhängig vom Ernährungszustande und der Individualität normalerweise etwa 2,0 Proz. des Gesamtstickstoffs auf die Summe der Oxyproteïnsäuren entfielen. Diese Relation erfuhr selbst im lange währenden Hunger keine dauernde und regelmäßige Verschiebung und deutet auf eine hochgradige Konstanz des Verhältnisses zwischen Eiweißzerfall und Oxyproteïnsäurenausscheidung hin.

5. Bei der Phosphorvergiftung wurde übereinstimmend mit den Angaben von Bondzyński und Gottlieb eine erhebliche Verschiebung dieses Verhältnisses zugunsten der Oxyproteïnsäuren beobachtet.

6. Auch bei mehreren anderen Tiergattungen (Pferd, Kaninchen, Gans) fanden sich hinsichtlich der Größenordnung der Oxyproteïnsäurefraktion ähnliche Verhältnisse wie beim Menschen und beim Hunde.

7. In der Fraktion der im Wasser löslichen, durch Alkohol fällbaren Barytsalze fand sich nach Beseitigung der Oxyproteïnsäuren eine Stickstofffraktion („Reststickstoff“), die im normalen Menschenharn 0,7 bis 2,2 Proz., im Hundeharn 0,3 bis 2,1 Proz.

des Gesamtstickstoffs betrug. Bei Phosphorvergiftung stieg dieser Rest bis auf 5,5 Proz. Der für gänzlich unbekannte Substanzen im normalen Menschen- und Hundeharn verbleibende Stickstoffrest ist nicht sehr beträchtlich.

8. Die Substanzen der Oxyproteïnsäuregruppe liefern bei der hydrolytischen Spaltung Leucin und wahrscheinlich auch andere Aminosäuren, dialysieren ziemlich leicht und sind als Eiweißabbauprodukte, vielleicht als Polypeptide zu betrachten.

Wien, Juli 1907.

XXVI.

Über die Beziehungen der Autolyse zur Zellverfettung.

Von Dr. **Paul Saxl.**

Ausgeführt unter Leitung des a. ö. Professors Dr. O. v. Fürth im physiologischen Institut der Wiener Universität.

1.

Seitdem die pathologischen Anatomen das Auftreten einer „fettigen Degeneration" im Verlaufe zahlreicher Krankheitsprozesse und Vergiftungen kennen gelernt haben, ist die Frage, aus welcher Quelle das dabei sichtbar werdende Fett stamme, Gegenstand außerordentlich zahlreicher Untersuchungen geworden und galt insbesondere die Phosphorvergiftung von jeher als klassisches Objekt für Experimente auf diesem Gebiete.

Nachdem lange Zeit die auf der Voitschen Fettbildungslehre basierende Vorstellung von einer Umwandlung des Zellprotoplasmas in Fett herrschend gewesen war und insbesondere durch die Versuche von Bauer, Leo, Polimenti u. a. ausreichend gestützt schien, haben es in neuerer Zeit eine Reihe von Versuchen, wie diejenigen von Athanasiu (in Pflügers Laboratorium), Taylor, Kraus und Sommer, vor allem aber die zahlreichen Arbeiten Rosenfelds, sehr wahrscheinlich gemacht, daß es sich bei der Phosphorvergiftung gar nicht um eine Neubildung von Fett, vielmehr um eine Einwanderung desselben aus den im Organismus befindlichen Fettdepots handle[1]).

---

[1]) Auf eine Wiedergabe der außerordentlich umfangreichen einschlägigen Literatur muß hier verzichtet werden und dürfte es in dieser Hinsicht genügen, auf die ausführlichen Sammelreferate von Rosenfeld über Fettbildung in den Ergebnissen der Physiologie 1, 651 und 2, 50, sowie auf die betreffenden Abschnitte in der neuesten Auflage des Hammarstenschen Lehrbuches (1907) zu verweisen.

Um so überraschender scheint auf den ersten Blick eine Mitteilung von Mavrakis[1]), dem es auf experimentellem Wege, an einer Kaninchenleber extra corpus, also unter Verhältnissen, wo von einer Fetteinwanderung gar keine Rede sein konnte, gelang, eine histologisch sehr deutlich nachweisbare Zellverfettung zu erzeugen. Mavrakis zerrieb gelben Phosphor in Wasser und injizierte diese Aufschwemmung in die Vena portae der einem frisch getöteten Tiere entnommenen Leber. Dann legte er das Organ in Toluolwasser und beließ es 12 bis 24 Stunden lang im Brutschrank. An mit Osmium gefärbten Schnitten eines solchen Organes sieht man in den Zellen zahlreiche kleinere und größere Fetttropfen, die besonders in den peripheren Teilen der Acini liegen; einzelne Zellen sind ganz mit Fett erfüllt und erscheinen im Mikroskop als schwarze Flecken. Mavrakis deutet diesen Befund, den ich, wie ich vorausschickend bemerken möchte, bestätigen konnte, im Sinne eines Degenerationsvorganges, durchaus analog demjenigen, welcher sich bei der Phosphorvergiftung intra vitam vollzieht. „Die Steagotenesis", sagt Mavrakis[2]), „die nach Vergiftung durch Phosphor auftrat, ist der Umwandlung des Zellenplasmas zuzuschreiben und wird dabei das Fett nicht etwa aus anderen Körperteilen zugeführt. Bekanntlich besteht das Protoplasma der Zellen aus verschiedenen Elementen, unter denen das Albumin die erste Stelle einnimmt. Wir halten daher den Schluß für sehr berechtigt, daß ein großer Teil des Fettes durch Umwandlung dieses Albumins erzeugt würde, zum mindesten aber in jenen Leberzellen, die ganz und gar in Fettzellen verwandelt waren."

Es ergab sich nun zunächst die Frage, ob die in den Mavrakis schen Versuchen beobachtete Zellverfettung überhaupt auf einer Fettneubildung oder aber nur auf einer histologischen Sichtbarmachung des schon vorhandenen Fettes beruht[3]).

Eine derartige Sichtbarmachung von Fett in der Zelle ist auch schon von anderen Autoren und zwar bei der normalen Autolyse der Organe angenommen worden. So fand Zahn[4]) in

---

[1]) C. Mavrakis, Untersuchungen über die Steatogenesis der Organe. Arch. f. Anat. u. Phys. 1904, S. 95.

[2]) l. c., S. 99.

[3]) Vgl. auch Di Christine, Die chemischen Veränderungen bei der fettigen Degeneration in Beziehung zu den anatomischen. Virchows Arch. 181, 509.

[4]) Wilh. Zahn, Untersuchungen über das Vorkommen von Krankheitskeimen im Blute gesunder Tiere. Virchows Arch. 1884.

aseptisch aufbewahrtem Blute freie Fetttröpfchen; Hauser[1]) sah Fett in Muskelfasern, Leber, Niere, Kraus[2]) in der Leber, Wentscher[3]) und Lindemann in den Epithelien des Rete Malpighi auftreten, wenn die genannten Organe der aseptischen Autolyse überlassen wurden. Kraus[4]) untersuchte nun das Ätherextrakt von Leberstücken in frischem Zustande und nach 14tägiger aseptischer Autolyse und fand keine Vermehrung desselben. Ebensowenig fand Rosenfeld[5]) mit seiner Alkohol-Chloroformextraktionsmethode eine Vermehrung des Fettes autolysierender Hautstücke. Siegert[6]) bestimmte im Laboratorium Hofmeisters die höheren Fettsäuren in frischen und autolysierten Leberstücken und fand keine Vermehrung derselben. Auch sei der Beobachtung Fr. Müllers[7]) gedacht, der Fett in Tröpfchen bei der Autolyse der pneumonisch infiltrierten Lunge auftreten sah; seine chemischen Bestimmungen ergaben aber, daß das Fett nicht vermehrt war. Es sei hier endlich die von Heffter[8]) konstatierte, von Leo und von Athanasiu[8]) bestrittene, von Waldvogel und Mette[9]) aufs neue behauptete Tatsache der Lecithinabnahme in der Leber phosphorvergifteter Tiere erwähnt. Waldvogel konnte bei Zusatz von sterilem Lebersaft zu Lecithin eine Abnahme des Lecithins und eine Zunahme der höheren Fettsäuren nachweisen; einen identischen Vorgang fand er bei der aseptischen Leberautolyse. Diese Tatsache des Lecithin- bzw. des Protagonschwundes verwertete Fr. Müller zur Erklärung der „Fettdegeneration", insofern aus Lecithin, Protagon usw. höhere Fettsäuren entstehen sollen, die sich mit Osmium färben, während Lecithin und Protagon keine Osmiumfärbung geben (Neubauer und Langstein[10]). — Auf Grund

[1]) A. Hauser, Über das Vorkommen von Mikroorganismen im lebenden Gewebe gesunder Tiere. Arch. f. experim. Path. 20 (1886).

[2]) Fr. Kraus, Über die in abgestorbenen Organen spontan eintretenden Veränderungen. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 22 (1886).

[3]) Wentscher, Über das Eigenleben menschlicher Epidermiszellen außerhalb des Organismus. Zieglers Beitr. 29 (1898).

[4]) Fr. Kraus, l. c.

[5]) G. Rosenfeld, Ergebnisse der Physiologie 1, 90 (1903).

[6]) F. Siegert, Das Verhalten des Fettes bei der Autolyse der Leber. (Aus dem phys.-chem. Institut in Straßburg.) Diese Beiträge 1, 114.

[7]) Fr. Müller, zitiert nach G. Rosenfeld, Asher u. Spiro, l. c.

[8]) Zitiert nach Rosenfeld, Fettbildung, Asher u. Spiro, l. c.

[9]) Münch. med. Wochenschr. 1906, S. 403; vgl. auch Waldvogel, Autolyse und fettige Degeneration, Virchows Arch. 77, 1 und Derselbe, Die durch Fermente bewirkte Umwandlung bei der fettigen Degeneration. Zeitschr. f. phys. Chemie 42, 200.

[10]) Neubauer und Langstein, Versammlung d. Naturforscher und Ärzte 1903.

dieser Tatsachen gehen Waldvogel und Mette[1]) soweit, Autolyse und echte Zellverfettung in jedem Falle zu identifizieren, während Friedrich Müller[1]) nur die Erscheinungen bei der Degeneration des Nerven, die Vorgänge bei der Rückbildung der Thymus, die Autolyse der Lunge und der Leukocyten in eine Linie stellt.

Im Gegensatz zu den Angaben dieser Autoren, denen zufolge es sich bei der Autolyse um keine Vermehrung des Fettbestandes der Organe, sondern nur um ein Sichtbarwerden von bis dahin histologisch nicht sichtbarem Fett handle, behauptet Stolnikow[2]) eine effektive Vermehrung des Fettes durch postmortale Fettbildung; Kotsowsky[3]) gibt an, daß das Ätherextrakt von Leberstücken während der aseptischen Konservierung von 8 bis 10 Proz. auf 15 bis 20 Proz. steige. Von besonderem Interesse erscheint aber eine aus jüngster Zeit stammende Angabe von Hildesheim und Leathes[4]). Dieselben bestimmten Fett in frischen und autolysierten Leberstücken; sie fanden eine Zunahme der Fettsäuren während der Autolyse; diese Zunahme war besonders groß, wenn zu den autolysierenden Leberstücken Glykogen zugesetzt wurde; daraus schlossen die genannten Autoren, daß sich während der Autolyse aus Glykogen höhere Fettsäuren bilden. Es lag daher nahe, jene Zellverfettung, die Mavrakis als Zellinfiltration ansprach, mit der Autolyse in Zusammenhang zu bringen.

Jedoch unterscheiden sich die histologischen Bilder der gewöhnlichen Autolyse und jener nach Phosphorinjektion in die Vena portae ganz bedeutend durch den der Schätzung nach geringen Fettgehalt im ersten, die starke Verfettung im zweiten Falle; auch tritt diese spärliche histologisch wahrnehmbare Fettzulage bei der normalen Autolyse erst nach mehrtägiger, wenn nicht mehrwöchentlicher Autolyse auf und ist so gering, daß Dietrich[5]) die Ähnlichkeit der mikroskopischen Bilder bei Autolyse und fettiger Degeneration bestreitet. Anders beim

---

[1]) l. c.

[2]) Stolnikow, Vorgänge in den Leberzellen, insbesondere bei Phosphorvergiftung. Arch. f. Anat. u. Physiol., Phys. Abt., Suppl. 1 (1887).

[3]) Kotsowsky, Études sur les modifications des cellules dans leur mort lente. Arch. de sciences Biol. St. Pétersbourg 1896.

[4]) Hildesheim und Leathes, On the synthesis of higher fatty acids in the liver. Journal of physiol. 31 (1904). (Proc. Physiol. Soc. I.)

[5]) A. Dietrich, Experimente zur Frage der fettigen Degeneration. Münch. med. Wochenschr. 1904, S. 15, 10—12.

Mavrakisschen Versuche, wo wir sehr reichlich Fett auftreten sahen.

Nun hat aber Jacoby[1]) im Straßburger physiologisch-chemischen Institute nachgewiesen, daß die Leber von mit Phosphor vergifteten Tieren stärker autolysiere als die normale. So war denn die Möglichkeit gegeben, daß der Phosphor, der im Mavrakisschen Versuche in die Leber injiziert wird, eine Steigerung der Autolyse bedinge.

Wir haben uns daher, um eine Klärung der Sachlage zu erzielen, folgende Fragen vorgelegt:

1. Vermag Phosphor nicht nur intra vitam, sondern auch extra corpus mit Organen in Berührung gebracht eine Steigerung autolytischer Vorgänge hervorzurufen?[2]).

2. Vollzieht sich bei der normalen oder durch Phosphor gesteigerten Autolyse eine Neubildung von Fett bzw. höherer Fettsäuren?

3. Handelt es sich bei der „Fettdegeneration" in Mavrakis' Versuch um eine tatsächliche Neubildung oder nur um Sichtbarwerden früher unsichtbaren Fettes?

Es sei mir gestattet, im folgenden über die experimentelle Beantwortung dieser Frage zu berichten.

2. Die Steigerung der Autolyse durch Phosphorzusatz.

Daß die Autolyse der Leberzellen beim phosphorvergifteten Tiere gesteigert ist, ist von Jacoby[3]) bewiesen worden. Er konnte schon unmittelbar post mortem eine Vermehrung des Amidstickstoffs in der Phosphorleber nachweisen, die nach 14tägiger Autolyse noch weit beträchtlicher war. „Diese Befunde zeigen", sagt Jacoby, „daß die Phosphorleber schon im lebenden Tiere eine Veränderung erfährt (Auftreten von Leucin und Tyrosin, Ver-

[1]) Jacoby, Über die Beziehungen der Leber- und Blutveränderungen bei Phosphorvergiftung zur Autolyse. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.) Zeitschr. f. phys. Chem. 30, 174 (1900).

[2]) Vgl. Jacobys (l. c., S. 177) Bemerkung: ... „Ferner wurde untersucht, ob die Anwesenheit von kleinen Mengen Phosphor die Wirkung des proteolytischen Fermentes steigert. Hauser hat den Einfluß zugesetzten Phosphors auf einige Fermente und synthetische Vorgänge untersucht, aber nur eine Störung der Hippursäuresynthese in der Niere durch Phosphor nachweisen können. In ähnlichen — vielleicht nicht genügend variierten Versuchen — habe ich auf Zunahme der Ammoniakbildung durch Zusatz von Phosphor zu Leberfermentenlösungen geachtet, aber keine gefunden."

[3]) Jacoby, l. c.

mehrung des leicht austreibbaren Stickstoffs), wie sie einem autolytischen Befunde entspricht. Die Vermutung, daß es sich um einen sehr ähnlichen, wenn nicht identischen Vorgang handelt, findet eine Stütze darin, daß die Phosphorlebern bei der Autolyse, wie die angeführten Versuche zeigen, eine besonders starke autolytische Ammoniakbildung aufweisen."

Jacoby wies also eine Steigerung der Leberautolyse beim phosphorvergifteten Tiere nach, wobei er es wahrscheinlich machte, daß die gesteigerte Autolyse schon intra vitam einsetzt.

Unsere Fragestellung lautete aber nunmehr: Steigert Phosphor, einem autolysierenden normalen Organ post mortem zugesetzt, die Autolyse? — Zur Beantwortung dieser Frage ließen wir gleiche Mengen von Organbrei oder Preßsaft mit und ohne Phosphorzusatz autolysieren und bestimmten die Zunahme des löslichen Stickstoffs.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt: Eine Leber wurde nach Entfernung der Gallenblase fein zerhackt; Portionen von je 3 g wurden abgewogen, zwei Portionen sofort verarbeitet, vier für die Autolyse bestimmte Portionen mit je 30 g physiologischer NaCl-Lösung versetzt, zu zwei Portionen je ein Stück gelben Phosphors hinzugefügt; sodann wurden alle vier Portionen mit dem gleichen Antiseptikum versetzt. Als solches verwendeten wir in den verschiedenen Versuchsreihen für je eine Portion Leberbrei: 0,5 ccm Toluol oder 30 ccm 1 proz. Fluornatriumlösung (in diesen Portionen unterblieb der Zusatz von NaCl-Lösung), oder 0,5 ccm Toluol + 2 ccm Chloroform oder aber eine Jodoformemulsion, die ich nach der Angabe von Vandervelde[1]) bereitete. Diese vier Portionen wurden in den Brutschrank gestellt und jeden Tag umgeschüttelt; in den Toluolversuchen wurden täglich 0,5 ccm Toluol nachgefüllt; nach mehrtägiger Autolyse wurde in diesen Portionen der lösliche Stickstoff bestimmt. Durch Züchtungsversuche überzeugte ich mich wiederholt von der Sterilität der einzelnen Portionen. — Von Preßsäften nahm ich einige (5 bis 20) Cubikcentimeter und behandelte sie in gleicher Weise wie den Organbrei.

Die coagulablen Eiweißkörper wurden nach den Angaben E. Schlesingers[2]) beseitigt. Die einzelnen Portionen wurden bis zur deutlich sauren Reaktion mit einigen Tropfen Essigsäure und mit 1 ccm einer 2 proz. Kaliummonophosphatlösung versetzt, zum Sieden erhitzt, auf dem Wasserbade auf 20 ccm eingedampft und dann filtriert. Im Filtrat wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Aus den beiden Parallelbestimmungen wurden dann die Mittelwerte berechnet. Der Übersichtlichkeit halber sind nur diese in der folgenden Tabelle angeführt.

---

[1]) A. J. Vandervelde, Über die Anwendung von Antisepticis bei Untersuchungen über Enzyme. Biochem. Zeitschr. 3, 2/4, S. 315.

[2]) Eugen Schlesinger, Untersuchungen über die Abhängigkeit der autolytischen Prozesse von physiologischen und pathologischen Verhältnissen. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut in Straßburg.) Diese Beiträge 4, 87 (1904).

Versuchs-Nummern	Organbrei	Gewichtsmenge	Enthält löslichen Stickstoff in g	Antiseptikum	Dauer der Autolyse Tage	Löslicher Stickstoff in g		Zunahme des löslichen Stickstoffs in g	
						bei normaler Autolyse	bei Autolyse mit Phosphorzusatz	Normale Autolyse	Phosphorautolyse
1	Kaninchenleber	3	0,016	Toluol	4	0,021	0,041	0,005	0,025
2	Rinderleber	3	0,010	"	2	0,024	0,039	0,014	0,029
3	Schweineleber	3	0,018	"	3	0,025	0,039	0,007	0,021
4	Katzenleber	3	0,017	"	6	0,074	0,082	0,057	0,065
5	Kaninchenleber	3	0,007	Toluol + Chloroform	2	0,011	0,022	0,004	0,015
5a	"	3	0,007	"	10	0,024	0,025	0,017	0,018
6	"	3	0,007	1 proz. FlNa-Lösung	6	0,025	0,028	0,018	0,021
7	"	3	0,011	"	4	0,024	0,029	0,013	0,017
8	"	3	0,007	Jodoform-emulsion	2	0,041	0,043	0,034	0,036
	Preßsaft								
9	Kaninchenleber	—	—	Toluol + Chloroform	3	0,014	0,009	—	—
10	"	—	0,010	"	3	0,015	0,019	0,005	0,009
11	Kaninchenmuskel	—	0,009	"	3	0,014	0,017		
								0,005	0,008
12	"	—	0,022	"	3	0,034	0,038	0,012	0,016

Diese Versuche zeigten, insoweit Toluol als Antiseptikum zur Anwendung kam, übereinstimmend eine Steigerung der Autolyse durch Phosphorzusatz. Diese Steigerung beträgt in den oben angeführten Versuchen 14 bis 400 Proz. der bei normaler Autolyse gefundenen Zunahme des löslichen Stickstoffs. Daß dieselbe im Beginn der Autolyse am stärksten ist, erkennt man deutlich im Versuch 5 und 5a. Nach zweitägiger Autolyse zeigen sich große Differenzen zwischen Autolyse mit und ohne Phosphorzusatz. Nach zehntägiger Autolyse ist diese Differenz fast verschwunden. Bei den Versuchen unter Zusatz von Fluornatrium, sowie bei den Preßsäften, die nur eine sehr schwache Autolyse zeigten, war nur eine geringe Steigerung der Autolyse durch Phosphor zu erzielen.

Eine sehr bedeutende Steigerung der Autolyse erhielten wir mit einem Organpulver, das von Herrn Dozenten W. Wiechowsky[1])

[1]) W. Wiechowsky, Eine Methode zur chemischen und biologischen Untersuchung überlebender Organe. (Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.) Diese Beiträge 9, 5/7, S. 232.

im Prager pharmakologischen Institut nach seiner Methode zur Untersuchung überlebender Organe bereitet und uns in liebenswürdigster Weise zur Verfügung gestellt worden war.

Versuch 13.

	enthält löslichen Stickstoff:
Normale Leber (pulverisiert) 2 g	0,021 g
Dieselbe Menge pulverisierter Leber nach fünftägiger Autolyse	0,028 g
Dieselbe Menge pulverisierter Leber nach fünftägiger Autolyse mit Phosphorzusatz	0,049 g
Demnach Zunahme des löslichen Stickstoffs bei normaler Autolyse	0,007 g
Demnach Zunahme des löslichen Stickstoffs bei Phosphorautolyse	0,028 g

So finden wir also, daß Phosphor, zu autolysierenden Organen zugesetzt, die Autolyse steigert. Da nach den übereinstimmenden Angaben von Wiener[1]) und Baer und Loeb[2]) geringe Säuremengen die Autolyse fördern, läge es vielleicht nahe, diese Steigerung auf die durch langsame Oxydation des Phosphors in der Autolysenflüssigkeit entstehenden kleinen Phosphorsäuremengen zu beziehen. Ob diese oder aber eine dem Phosphor eigentümliche Wirkung auf das autolytische Ferment den beobachteten Erscheinungen zugrunde liegt, vermag ich vorderhand nicht zu entscheiden.

3. Autolyse und Fettbildung.

Zur Prüfung der Frage, ob bei der Autolyse eine Neubildung von höheren Fettsäuren erfolgen könne, gingen wir von der Annahme aus, daß, wenn überhaupt bei der Leberautolyse eine Fettbildung stattfindet, jedenfalls bei der gesteigerten Autolyse der Leber eines phosphorvergifteten Tieres (Jacoby[3]) oder bei der Erhöhung derselben durch postmortalen Phosphorzusatz eine Fettbildung in größerem Umfange stattfinden dürfte. — Einzelnen autolysierenden Portionen wurde überdies einprozentige Zuckerlösung zugesetzt, um die oben erwähnte Angabe von Hildesheim und

---

[1]) H. Wiener, Über den Einfluß der Reaktion auf autolytische Vorgänge. (Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität in Prag.) Zentralbl. f. Physiol. 19, 349.

[2]) J. Baer und A. Loeb, Über die Bedingungen der autolytischen Eiweißspaltungen in der Leber. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 53, 1.

[3]) l. c.

Leathes[1]), derzufolge Glykogenzusatz die Fettbildung bei der Autolyse steigere, einer Nachprüfung zu unterziehen. (Ich setzte statt Glykogen Zucker zu, da ja die autolysierende Leber durch ihr diastatisches Ferment ohnedies Glykogen sehr schnell in Zucker verwandelt.)

Methodik der Fettbestimmung. Schon Siegert[2]) betonte, daß es sich bei der Frage der Fettneubildung nur um die Neubildung von höheren Fettsäuren handeln könne. Daß es bei der Autolyse zur Neubildung niederer Fettsäuren, wie Bernsteinsäure, Rechts- und Linksmilchsäure komme, wurde von Magnus-Levy[3]) nachgewiesen. Siegert[2]) bestimmte die höheren Fettsäuren, indem er nach Verseifung des Ätherextrakts dieselben aus der wässerigen Seifenlösung durch Mineralsäuren abschied, abfiltrierte und zur Wägung brachte.

In den folgenden Versuchen wurde zur Bestimmung der gesamten Fettsäuremenge die Methode von Liebermann und Szekely[4]) verwendet. Diese Methode erschien uns deswegen besonders geeignet, weil dabei nicht nur jene Fettsäuren, die als Neutralfette, Seifen und Fettsäuren in der Leber enthalten sind, ermittelt, sondern weil auch die Lecithine, Protagone, Jekorine usw. mit Sicherheit aufgespalten und die darin enthaltenen Fettsäuren bestimmt werden.

5 g feuchter Substanz werden in einem von den Autoren für diese Zwecke angegebenen Kolben mit 30 ccm einer 50 proz. Kalilauge eine halbe Stunde lang gekocht, nach dem Erkalten mit 30 ccm Alkohol (97 proz.) versetzt, abermals durch zehn Minuten gekocht, 100 ccm einer 20 proz. Schwefelsäure bis zur stark sauren Reaktion unter beständiger Kühlung zugesetzt, sodann 50 ccm Petroläther hinzugefügt und gut durchgeschüttelt. Nach Zusatz von soviel konzentrierter Kochsalzlösung, daß die Oberfläche der wässerigen Flüssigkeit eine bestimmte am Kolben angebrachte Marke erreicht, läßt man den Petroläther absetzen, hebt 20 ccm ab, fügt 40 ccm säurefreien Alkohol (97 proz.) und 1 ccm einer einprozentigen Phenolphtaleïnlösung hinzu und titriert mit $^{1}/_{10}$ n-alkoholischer Kalilauge. Nach der Titration wird die Flüssigkeit in ein 80 ccm fassendes Wägegläschen übertragen, der Alkohol und Petroläther auf dem Wasserbade verjagt und das Wägegläschen mit dem Rückstande nach einstündigem Verweilen im Trockenschranke gewogen. Die Berechnung der gesamten Fettsäuremengen erfolgt dann aus den beiden erhaltenen Werten: dem Titrations- und Wägewert.

---

[1]) l. c.

[2]) l. c.

[3]) Magnus-Levy, Über die Säurebildung bei der Autolyse der Leber. Diese Beiträge 2 (1902).

[4]) Liebermann und Szekely, Eine neue Methode der Fettbestimmung in Futtermilch, Fleisch, Koth usw. Pflügers Arch. 72 (1898).

Nach dieser auch von Tangl und Weiser[1]) erprobten Methode wurde die Gesamtmenge ätherlöslicher Säuren, also sowohl höhere als auch niedere Fettsäuren bestimmt.

Um eine gesonderte Bestimmung der höheren Fettsäuren zu erzielen, auf die es uns ja zur Entscheidung der Frage der Neubildung von Fett bei der Autolyse ankam, haben wir die beschriebene Methode in folgender Weise modifiziert: Der nach Ausführung der Liebermann-Szekelyschen Methode zurückbleibende Petrolätherrückstand wird im Wägegläschen in $^1/_{10}$ n-Natronlauge gelöst, sodann Salzsäure zugesetzt, bis die durch das Phenolphtaleïn bedingte Rotfärbung verschwindet; durch die Salzsäure werden die Fettsäuren freigemacht und schwimmen als Tropfen und Flocken in der Flüssigkeit; diese werden mit Hilfe eines kleinen Filterchens abgetrennt und das Filter sorgfältig nachgewaschen, bis das Waschwasser neutral reagiert. Sodann wird das Filter an der Luft getrocknet, hierauf Äther durch das Filter hindurch in das Wägegläschen gegossen (wobei dieser mit größter Leichtigkeit die Fettsäuren aufnimmt), das Filter nochmals mit Äther durchgespült, der Äther verjagt und der nunmehr ausschließlich aus höheren, im Wasser unlöslichen Fettsäuren bestehende Rückstand gewogen.

Trotzdem bei den zahlreichen Manipulationen Verluste nicht ganz zu vermeiden sind und diese bei den hier in Betracht kommenden kleinen Fettmengen (wie Kontrollproben mit abgewogenen kleinen Quantitäten ergaben) bis 15 Proz. ausmachen können, glaubten wir dennoch für unsere Zwecke, um eine Irreführung durch niedere Fettsäuren zu vermeiden, dieser Methode vor anderen den Vorzug geben zu sollen.

Versuch 14.

Ein Kaninchen wurde durch tägliche Injektion von 1 ccm einer einprozentigen Phosphoremulsion im Laufe von vier Tagen vergiftet. Die Leber zeigte hochgradige Verfettung. In zwei Portionen zu 5 g wurde das Fett sofort bestimmt. Vier Portionen zu 5 g wurden zu einem feinen Brei zerschnitten und zerrieben, sodann mit 50 ccm physiologischer NaCl-Lösung, 0,8 ccm Toluol und 3 ccm Chloroform und zwei Portionen überdies mit 1 g Traubenzucker versetzt; die vier Portionen wurden in gut verschlossenen Pulvergläsern zur Autolyse in den Brutschrank gestellt und nach drei- bzw. zehntägiger Autolyse deren Fettgehalt bestimmt. Die Pulvergläser wurden täglich mit 0,5 ccm Toluol nachgefüllt und umgeschüttelt. Die einzelnen Portionen ergaben folgenden Fettgehalt:

---

[1]) F. Tangl und Weiser, Einige Fettbestimmungen nach der Liebermannschen Untersuchungsmethode. Pflügers Archiv 72, 361.

Je 5 g Leber enthielten:	Gesamtgehalt an Fettsäuren		Höhere Fettsäuren in g
	Titrationswert in Cubikcentimetern $^{1}/_{10}$ n-Kalilauge	Gewogen als Seifen in g	
frisch	19,0	0,570	0,310
frisch	18,5	0,495	0,265
nach dreitägiger Autolyse ohne Zuckerzusatz	18,0	0,408	0,245
nach dreitägiger Autolyse mit Zuckerzusatz	22,0	0.550	0,300
nach zehntägiger Autolyse ohne Zuckerzusatz	13,5	0,375	0,195
nach zehntägiger Autolyse mit Zuckerzusatz	22,5	0,505	0,220

Versuch 15.

Dieselbe Versuchsanordnung wie in Versuch 14. Jedoch wurden statt physiologischer Natriumchloridlösung und Toluolchloroform in dieser Versuchsreihe 50 ccm einprozentiger Fluornatriumlösung zugesetzt.

Je 5 g Leber enthielten:	Gesamtgehalt an Fettsäuren		Höhere Fettsäuren in g
	Titrationswert in Cubikcentimetern $^{1}/_{10}$ n-Kalilauge	Gewogen als Seifen in g	
frisch	22.0	0,465	0,150
frisch	23,5	0,425	0,190
nach siebentägiger Autolyse ohne Zuckerzusatz	13,5	0,265	0,170
desgleichen	13,5	0,270	0,175
nach siebentägiger Autolyse mit Zuckerzusatz	13,5	0,255	0,185
desgleichen	14,0	0,285	0,180

Versuch 16.

Einem frisch getöteten Kaninchen wurde die Leber entnommen, fein zerhackt, der Brei in Portionen von je 5 g abgewogen und in zwei Portionen der Fettgehalt sofort bestimmt. Vier Portionen wurden mit je 50 ccm physiologischer NaCl-Lösung, 0,5 ccm Toluol und 3 ccm Chloroform und zwei derselben — um eine Steigerung der Autolyse zu bewirken — außerdem mit einem Stück gelben Phosphors versetzt. Alle vier Portionen wurden in den Brutschrank gestellt, täglich mit 0,5 ccm Toluol versetzt und umgeschüttelt und nach dreitägiger Autolyse in bezug auf ihren Fettgehalt analysiert.

Je 5 g Leber enthielten:	Gesamtgehalt an Fettsäuren		Höhere Fettsäuren in g
	Titrationswert in Cubikcentimetern 1/10 n-Kalilauge	Gewogen als Seifen in g	
frisch	9,0	0,205	0,090
frisch	9,5	0,225	0,110
nach dreitägiger Autolyse	9,0	0,215	0,100
desgleichen	9,0	0,205	0,105
nach dreitägiger Autolyse mit Phosphorzusatz	10,0	0,275	0,135
desgleichen	9,5	0,225	0,125

Abgesehen von Schwankungen, die innerhalb der Fehlergrenze liegen, zeigen die in den obigen Versuchen angeführten Zahlen, **daß auch bei der durch Phosphorvergiftung bedingten oder durch postmortalen Phosphorzusatz herbeigeführten Steigerung der Leberautolyse keine deutliche Vermehrung höherer Fettsäuren stattgefunden hat und daß auch Zuckerzusatz zur autolysierenden Leber phosphorvergifteter Tiere keine solche herbeizuführen vermochte.**

4. Fettbestimmungen in der nach Mavrakis behandelten Leber.

Versuchsanordnung. Um die von Mavrakis beschriebene Verfettung zu erzielen, hielt ich mich im Wesentlichen an die von diesem Autor angegebene Versuchsanordnung.

Einem frisch getöteten Kaninchen wurde die Leber entnommen, ein Stück abgeschnitten und in den zugehörigen Pfortaderast eine Aufschwemmung von Phosphor in Wasser injiziert. Mavrakis stellte sich eine solche Aufschwemmung durch Zerreiben eines Stückes gelben Phosphors in Wasser her. Ich brachte ein solches Stück unter Wasser bei 45° zum Schmelzen und schüttelte dann kräftig; dabei zerstäubt der Phosphor und bleibt auch bei Zimmertemperatur in kleinen und kleinsten Partikelchen in dem mit gelöstem Phosphor gesättigten Wasser verteilt. Eine derartige Aufschwemmung injizierte ich nun auf dem Wege des Pfortaderastes, stach außerdem noch an einigen anderen Stellen mit der Pravazspritze ein und injizierte, wodurch das Leberstück gründlich mit Phosphor imprägniert wurde. Dasselbe wurde sodann in physiologische Kochsalzlösung gelegt und in den Brutschrank gestellt. Gleichzeitig wurden Vergleichsstücke derselben Leber aufgestellt, die einfach mit physiologischer Kochsalzlösung injiziert worden waren.

Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Stücke dem Brutschranke entnommen, kleine Proben abgeschnitten, in einprozentige Osmiumlösung eingelegt, mit Wasser, Alkohol von steigender Konzentration und Xylol behandelt, in Paraffin eingebettet und sodann geschnitten. Man sieht dann an

den mit Phosphor behandelten Stücken jene ausgedehnte Zellverfettung, wie sie Mavrakis beschrieben hat. In der Vergleichsprobe sind nur ganz spärliche, durch Osmium schwarz gefärbte Punkte zu sehen.

Um mich aber in den Versuchen gegen den Eintritt von Fäulnis unbedingt zu schützen, versetzte ich das Phosphorwasser und ebenso die physiologische Kochsalzlösung, in die die Leberstücke gelegt werden, von vornherein mit Toluol; oder ich schwemmte den Phosphor in einprozentiger Fluornatriumlösung auf und verwendete statt der physiologischen Kochsalzlösung dieselbe Fluornatriumlösung, in die ich die Leberstücke einlagerte. Wie ich mich wiederholt überzeugen konnte, hindern diese Antiseptica das Auftreten des histologischen Bildes nicht. — Die Vergleichsstücke wurden gleichfalls mit physiologischer Kochsalzlösung + Toluol oder mit Toluol sorgfältig durchgespült. — Wiederholt wurden aerobe und anaerobe Züchtungsversuche angestellt, die stets negativ ausfielen.

Nachdem ich mich auf diese Weise von dem Auftreten des von Mavrakis beschriebenen histologischen Bildes überzeugt hatte, wurde mit den im histologischen Sinne verfetteten und in den nicht verfetteten Portionen Fettbestimmungen ausgeführt.

Dabei war die Versuchsanordnung folgende. Einem eben getöteten Kaninchen wurde die Leber entnommen und nach Entfernung der Gallenblase in drei Stücke zerschnitten, womöglich so, daß bei zwei Stücken ein Pfortaderast erhalten blieb. Alle drei Stücke wurden sorgfältig gewogen. Eines sofort auf seinen Fettsäuregehalt geprüft; eines mit Phosphoraufschwemmung (wie oben geschildert), eines mit Toluolkochsalzlösung bzw. Fluornatriumlösung injiziert und auf 24 bis 48 Stunden in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wurden von diesen Leberportionen kleine gewogene Stückchen abgeschnitten und zur histologischen Untersuchung verwendet. Im Rest wurden die Fettsäuren bestimmt.

Die Fettsäurebestimmung wurde ebenso wie in den Versuchen 12 bis 15 ausgeführt. Zunächst bestimmte ich den Gesamtgehalt an Fettsäuren nach Liebermann und Szekely. In dem so gewonnenen Petrolätherextrakt wurden dann noch die höheren Fettsäuren bestimmt. — Da ich es hier mit größeren Organmengen zu tun hatte, verringerten sich die im vorigen Kapitel erwähnten Versuchsfehler um ein Wesentliches.

Versuche Nr. 17, 18, 19 und 20.

Ein Stück Kaninchenleber wurde frisch auf seinen Fettgehalt untersucht, eines mit Toluolwasser, eines mit einer Aufschwemmung von Phosphor in Toluolwasser injiziert (Versuche 17 u. 18) oder aber das Toluolwasser durch einprozentige Fluornatriumlösung ersetzt (Versuche 19 u. 20).

(Tabelle auf folgender Seite!)

Diese Versuche zeigen übereinstimmend, daß eine außerhalb der Fehlergrenze liegende Vermehrung der höheren Fettsäuren bei der durch Phosphorinjektion erzeugten Zellverfettung nicht stattfindet. Die Annahme von Mavrakis, daß es sich bei der von ihm beschriebenen Zellverfettung um eine Fettneubildung aus

Versuchs-Nummern	Gewicht d. untersuchten Leberstücke in g	Zustand der Organe	Histologischer Befund	Bakteriologischer Befund	Gesamtgehalt an Fettsäuren: Titrationswert in Cubikcentimetern $^1/_{10}$ n-Kalilauge	Gesamtgehalt an Fettsäuren: Als Seifen gewogen in g	Höhere Fettsäuren in g	Auf 10 g Lebersubstanz berechnet: Gesamtzahl an Fettsäuren: Titrationswert in Cubikcentimetern $^1/_{10}$ n-Kalilauge	Auf 10 g Lebersubstanz berechnet: Gesamtzahl an Fettsäuren: Als Seifen gewogen in g	Auf 10 g Lebersubstanz berechnet: Höhere Fettsäuren
17	5	frisch	—	—	10,5	0,240	0,130	20,1	0,480	0,260
	11	nach zweitägiger Autolyse	—	steril	22,8	0,494	0,240	22,6	0,449	0,219
	11	do., Phosphor injiziert	—	steril	22,0	0,448	0,248	20,0	0,401	0,226
18	$5^1/_2$	frisch	—	—	10,9	0,230	0,115	20,0	0,418	0,210
	8	nach eintägiger Autolyse	keine Verfettung	steril	15,4	0,345	0,165	19,2	0,431	0,206
	8	do., Phosphor injiziert	deutlich verfettet	steril	16,0	0,365	0,180	20,0	0,456	0,225
19	10	frisch	—	—	13,8	0,390	0,275	13,8	0,390	0,275
	10	nach zweitägiger Autolyse	—	—	16,3	0,420	0,268	16,3	0,420	0,268
	20	do., Phosphor injiziert	—	—	28,0	0,860	0,650	14,0	0,430	0,310
20	$17^1/_2$	frisch	—	—	17,0	0,544	0,278	9,6	0,311	0,160
	$17^1/_2$	nach viertägiger Autolyse	spärlich verfettet	steril	17,2	0,560	0,275	9,7	0,319	0,159
	$35^1/_2$	do., Phosphor injiziert	sehr starke Verfettung	steril	40,2	1,135	0,650	11,3	0,319	0,184

Eiweiß handle, wird daher hinfällig. Es findet keine Fettneubildung, sondern nur eine Sichtbarmachung des früher nicht wahrnehmbaren Fettes statt. Schon oben wurde auf die Analogie des Sichtbarwerdens von Fett bei der gewöhnlichen Autolyse und bei den durch Phosphor gesteigerten in den Mavrakisschen Versuchen hingewiesen. Es erscheint daher die Annahme berechtigt, daß es sich in den Mavrakisschen Versuchen um eine durch die Gegenwart von Phosphor gesteigerte Autolyse handelt, die zu einer gesteigerten Sichtbarmachung des Zellfettes führt. Ob dieser Vorgang zu der Verfettung bei intravitaler Phosphorvergiftung in irgendwelcher Beziehung steht, mag dahingestellt bleiben.

Zusammenfassung.

1. Gelber Phosphor, Organen postmortal zugesetzt, steigert die Autolyse derselben.

2. Bei der Autolyse findet, entgegen den Angaben der eingangs erwähnten Autoren, keine Neubildung höherer Fettsäuren statt; sie ist auch bei der gesteigerten Autolyse von Organen phosphorvergifteter Tiere selbst nach Zuckerzusatz nicht nachweisbar. Ebensowenig konnte bei der durch postmortalen Zusatz von Phosphor bedingten Steigerung der Autolyse eine Neubildung von Fett nachgewiesen werden.

3. Es gelingt durch Injektion einer Aufschwemmung von Phosphor in Toluolwasser oder in einer einprozentigen Fluornatriumlösung in einen Pfortaderast einer herausgenommenen Leber eine histologisch nachweisbare Zellverfettung zu erzielen, die mit dem mikroskopischen Bilde der Fettinfiltration bei Phosphorvergiftung große Ähnlichkeit aufweist (Mavrakis). Diese Zellverfettung geht ohne chemisch nachweisbare Fettvermehrung einher; es handelt sich daher nur um ein histologisches Sichtbarwerden von schon vorhandenem Fett und dürfte dieser Vorgang mit der durch die Anwesenheit von Phosphor bedingten gesteigerten Autolyse in Zusammenhang stehen.

Wien, Juli 1907.

XXVII.

Ein Beitrag zur Methodik der Versuche über Fettresorption aus isolierten Darmschlingen.

Von Dr. **Otto von Fürth**,
a. ö. Professor für medizinische Chemie an der Wiener Universität,

und Dr. **Julius Schütz**.

1.

Im Anschlusse an frühere Untersuchungen[1]), die wir über die Wirkung der Galle und ihrer Bestandteile auf das Pankreassteapsin ausgeführt hatten, sind wir zu der Frage gelangt, ob der bekannte Einfluß der Galle auf die Resorption der Fette ebenso auf ihren Gehalt an gallensauren Salzen bzw. auf die Cholsäurekomponente zurückzuführen sei, wie wir dies seinerzeit für ihre Wirkung auf die Fettspaltung gezeigt hatten.

Nun stehen bekanntlich für quantitative Versuche über Fettresorption im Darme im wesentlichen drei Wege offen: Der Ausnutzungsversuch per os verabreichter Nahrung, das Anlegen einer permanenten Darmfistel und endlich die Einführung bekannter Fettmengen in abgebundene Darmschlingen.

Da es uns vor allem darum zu tun war, die einzelnen Sekrete des Verdauungstraktes (Magensaft, Galle, Pankreassekret, Darmsaft) in ihrer getrennten Wirkung auf die Fettresorption zu studieren, konnten Fütterungsversuche für uns nicht weiter in Betracht kommen und wir hatten nur die Wahl zwischen Versuchen mit permanenten Darmfisteln oder mit abgebundenen Darmschlingen.

Auf die großen Übelstände der ersteren hat Bleibtreu[2])

---

[1]) O. v. Fürth und J. Schütz, Über den Einfluß der Galle auf die fett- und eiweißspaltenden Fermente des Pankreas. Diese Beiträge 9, 28 (1906).

[2]) M. Bleibtreu, Zur Methodik der Untersuchungen der Fettresorption im Darme. Deutsche mediz. Wochenschr., 2. August 1906, S. 1233.

kürzlich hingewiesen und namentlich hervorgehoben, daß beim Ausspülen einer Thiry-Vella-Fistel leicht ein Teil der Fettsubstanz in Form eines zähen Schleimes an der Darmwand haften bleibe und so unter Umständen eine viel größere Resorption vortäusche, als tatsächlich vorhanden war.

Wir haben es daher vorgezogen, an abgebundenen Darmschlingen zu arbeiten und haben eine größere Zahl von Versuchen mit Neutralfetten, Fettsäuren und Seifen mit und ohne Zusatz von Galle oder Pankreaspreßsaft in der Art ausgeführt, daß wir je zwei Vergleichsproben gleichzeitig in zwei benachbarte isolierte Darmschlingen einer Katze einführten.

Wie wir gleich bemerken möchten, hat die Methode unsere Erwartungen nicht voll erfüllt und sich nicht in dem Maße, wie wir es gehofft hatten, zur Beantwortung unserer Fragestellung geeignet erwiesen. Wir glauben aber dennoch, daß eine kurze Mitteilung unserer Versuchsergebnisse nicht nutzlos und vielleicht geeignet sein dürfte, den auf diesen und benachbarten Gebieten arbeitenden Fachgenossen manchen Umweg und Zeitverlust zu ersparen.

Zunächst einige Worte über die diesen Gegenstand betreffenden Literaturangaben, jedoch nur insoweit sie quantitative Fettresorptionsversuche an abgebundenen Darmschlingen betreffen.

Wir sind bei Durchsicht der neueren Literatur folgenden einschlägigen Angaben begegnet:

Hamburger[1]) führte Seife (0,8 bis 1,8 g in Form 5 prozentiger Lösung) in abgebundene Dickdarmschlingen von Hunden ein und erhielt innerhalb 16 Stunden Resorptionen von 0,25 bis 0,52 g. Lipanin (Gemisch von Olivenöl und Ölsäure) wurde bei Seifenzusatz viel besser resorbiert, als ohne einen solchen.

v. Tappeiner[2]) ließ von seinen Schülern neben zahlreichen Versuchen an Thiry-Vella-Fisteln gelegentlich auch einige an abgebundenen Darmschlingen ausführen. Aus Olivenölemulsionen (0,26 bis 1,43 g Fett entsprechend) wurde 3,3 bis 47,8 Proz. und bei Senfölzusatz 16,2 bis 66,5 Proz. des Fettes innerhalb einer Stunde aus Dünndarmschlingen von Hunden resorbiert, wobei Parallel-

[1]) H. J. Hamburger, Versuche über Resorption von Fett und Seife im Dickdarm. Arch. f. Anat. u. Phys. (Physiol. Abt.) 1900, 433.

[2]) H. v. Tappeiner, Über die Beeinflussung der Resorption der Fette im Dünndarm durch Arzneimittel; nach Arbeiten von M. Eschenbach, L. Lichtwitz und Gmeiner mitgeteilt. Zeitschr. f. Biol. 45, 222 (1904).

versuche in der Weise ausgeführt wurden, daß von zwei abgebundenen benachbarten Schlingen nur die eine Senföl enthielt.

Die eingehendsten Versuche in dieser Richtung sind im Laboratorium Bleibtreus[1]) ausgeführt worden: Hattori[2]) brachte in beiderseits durchschnittene und mit warmer physiologischer Kochsalzlösung ausgespülte Darmschlingen von Kaninchen und Hunden Seifen und Fettsäuren, teils in Substanz als Pulver oder Pasta (1,7 bis 4 g), teils als Lösung (0,4 g), teils als Emulsion (2,6 g) und erhielt innerhalb weniger Stunden in acht Versuchen Resorptionen von $7^1/_2$ bis 30 Proz., wobei die Aufsaugung der freien Fettsäuren leichter zu erfolgen schien, als diejenige der Seifen. Ferner hat erst in allerjüngster Zeit, als die Mehrzahl unserer Versuche bereits ausgeführt war, ein anderer Schüler Bleibtreus, F. Hercher[3]), eine größere Zahl einschlägiger Beobachtungen veröffentlicht. Ölsäure (1 bis 2 g) wurde unter Zusatz von etwas Wasser, Soda, glykocholsaurem Natron oder Gallenextrakt in die abgebundene Darmschlinge einer Katze eingeführt. Die Resorption nach 7 bis 12 Stunden betrug in 7 Versuchen 20 bis 67 Proz., in 16 Versuchen weniger als 20 Proz. Ein sicherer Einfluß des Zusatzes von Glycerin, Lecithin und Cholesterin war nicht wahrnehmbar; dagegen erwies sich Gallenzusatz in drei Doppelschlingenversuchen als wirksam. Die Resorption betrug

	a) Ölsäure	b) Lebertran	c) Gänsefett
ohne Galle	6 Proz.	— Proz.	— Proz.
mit „	26 „	14 „	14 „

Neutralfett mit Pankreaspulver ohne Galle wurde in zwei Versuchen reichlich resorbiert, ebenso Olivenöl (ein Versuch) bei Gegenwart von Galle und frischem Katzenpankreas.

Bleibtreu betont, daß die an sich schlechte Resorption der Seifen durch Gallenzusatz nicht verbessert, sondern eher verschlechtert und daß dabei, statt Fettresorption, häufig Fettsekretion beobachtet wurde. Auch ergab die Inspektion der Chylusgefäße in diesem Falle niemals das typische Bild der „Injektion“, d. h. der Füllung mit emulgiertem Fett, wohl aber, wenn man die Seifen durch Neutralfett ersetzte. „Sehr schön kann man auf diese

[1]) l. c.

[2]) Tetsu Hattori, Über Resorption von Seifen aus isolierten Darmschlingen. Inaug.-Diss. Greifswald 1905.

[3]) F. Hercher, Versuche über Fettresorption an isolierten Darmschlingen, nebst Beobachtungen über die fettlösende Wirkung der Gallensäuren. Inaug.-Diss. Greifswald, April 1907.

Weise", sagt Bleibtreu, „die Wirkung der Galle auf die Resorption der Fette nachweisen, indem man in eine Nachbarschlinge dieselben Stoffe unter Weglassung der Gallenbestandteile einführt. In der Schlinge ohne Galle ist nichts von Injektion zu sehen ... Ein ganz ähnliches Bild kann man aber auch erhalten, wenn man statt des Neutralfettes unter Weglassung des Pankreas ... Ölsäure in den Darm einführt."

Wir hatten dementsprechend gehofft, bei quantitativen Versuchen unter Zusatz von Galle, Pankreas oder ihren wirksamen Bestandteilen eindeutige Resultate zu erzielen; doch ist diese Erwartung nicht eingetroffen.

Wir gehen nunmehr zur Besprechung unserer Versuche über.

2. Versuchsmethode.

Wir führten unsere Versuche an ausgewachsenen Katzen aus, die einen Tag gehungert hatten. Um die schädliche Wirkung der bei Darmoperationen unvermeidlichen Abkühlung nach Möglichkeit hintanzuhalten, benutzten wir mit Ausnahme der allerersten Versuche einen heizbaren Operationstisch, d. h. einen großen, über einer Heizschlange befindlichen Kasten aus Weißblech, der die auf dem Brette fixierte, mit Äther narkotisierte Katze aufnahm und dessen aus verschiebbaren Blechplatten bestehender Deckel eine bequeme Regulierung der Innentemperatur ermöglichte. Der freigelegte Darm wurde auf mit warmer physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompressen ausgebreitet und fleißig berieselt. Es wurde der größte Teil des freien Dünndarms vorgeholt und durch drei Doppelligaturen in zwei annähernd gleich große Schlingen gesondert. Sodann wurde zwischen den beiden Fäden einer peripheren Doppelligatur inzidiert, das mit einem Hahn versperrbare Ansatzstück unserer Spritze in die Darmschlinge eingeführt und durch die Ligatur versichert, nunmehr die 15 ccm fassende gefüllte Spritze angesetzt und in die Schlinge hinein entleert, und der Vorgang meist zweimal wiederholt (derart, daß die in eine Schlinge eingeführte Flüssigkeitsmenge fast stets 45 cm betrug), der Spritzenansatz vorsichtig herausgezogen, während ein Assistent die Ligaturfäden fest anzog und sodann die andere Darmschlinge in analoger Weise mit der Parallelprobe beschickt. Bei einiger Übung gelang es so, praktisch in Betracht kommende Verluste leicht zu vermeiden. Schließlich wurden die Darmschlingen reponiert, das Abdomen durch Nähte geschlossen und das

3. Ver-

Nummer des Versuches	Kategorie des Versuches		Inhalt (ccm) der Darmschlinge	Lage	Länge[1]) cm	Vorbehandlung
I.	Seife	+ Galle	Stearinsäure Na 2 Proz., 45	p	—	θ
			„ „ 2 „ 40½ + G 4½	d	—	
II.			„ „ 2 „ 30	p	—	θ
			„ „ 2 „ 27 + G 3	d	—	
III.			„ „ 2 „ 45	p	60	θ
			„ „ 2 „ 40½ + G 4½	d	45	
IV.			„ „ 2 „ 45	p	55	θ
			„ „ 2 „ 40½ + G 4½	d	65	
V.			„ „ 2 „ 45	d	50	θ
			„ „ 2 „ 40½ + G 4½	p	60	
VI.			„ „ 2 „ 30	p	55	θ
			„ „ 2 „ 27 + G 3	d	55	
VII.			„ „ 1,7 „ 48	d	60	θ
			„ „ 1,7 „ 43,8 + G 4,8	p	45	
VIII.		+ Glycerin	„ „ 2 „ 45	p	60	θ
			„ „ 2 „ + einige ccm Glycerin	d	60	
IX.			„ „ 2 „ 45	p	—	θ
			„ „ 2 „ + Glycerin	d	—	
X.			Ölsaures Natron 1,97 Proz., 45	p	45	θ
			„ „ 1,97 „ + Glycerin	d	55	
XI.			„ Na 1,29 Proz., 45	p	60	θ
			„ „ 1,29 „ 42½ + G 2½	d	60	
XII.	Fettsäuren	+ Galle	Ölsäure 1,72 Proz., 45 } + ½ ccm Glycerin	p	—	θ
			„ 1,72 „ 42½ + G 2½ }	d	—	
XIII.			„ 1,72 „ 45	d	85	θ
			„ 1,72 „ 42½ + G 2½	p	85	
XIV.			„ 1,72 „ 45	d	60	D
			„ 1,72 „ 42½ + G 2½	p	60	
XV.			„ 1,72 „ 45	p	65	D
			„ 1,72 „ 42½ + G 2½	d	65	
XVI.		+ Pankreas + Galle	„ 1,72 „ 40½ + G 4½	p	40	D
			„ 1,72 „ 36 + G 4½ + PP 4½ . . .	d	65	
XVII.			„ 1,72 „ 40½ + G 4½	p	55	D
			„ 1,72 „ 36 + G 4½ + PP 4½ . . .	d	55	
XVIII.			„ 1,72 „ 40½ + G 4½	d	60	D
			„ 1,72 „ 36 + G 4½ + PP 4½ . . .	p	60	
XIX.			„ 1,72 „ 40½ + G 4½	p	60	D
			„ 1,72 „ 36 + G 4½ + PP 4½ . . .	d	50	
XX.			„ 1,72 „ 40½ + G 4½	d	—	D
			„ 1,72 „ 36 + G 4½ + PP 4½ . . .	p	—	

1) Die Längenangabe der Darmschlingen ist auf 5 cm abgerundet, da eine genaue

suche.

Methode	Eingeführte Menge g	Resorbierte Menge g	Resorbierte Menge Proz.	Dauer Stunden	Anmerkung
A	0,90 0,81	0,63 0,53	70 65	$2^1/_2$	—
A	0,60 0,54	θ θ	θ θ	$1^1/_4$	—
A	0,90 0,81	0,29 0,20	32 25	$1^1/_2$	—
A	0,90 0,81	0,12 0,01	13 1	$1^1/_2$	—
A	0,90 0,81	θ θ	θ θ	$3^1/_4$	geringe FS
A	0,60 0,54	0,17 θ	28 θ	3	geringe FS
A	0,82 0,73	0,17 θ	20 θ	6	—
A	0,90 0,90	θ 0,06	θ 6	6	—
A	0,90 0,90	0,15 0,12	16 13	6	—
A	0,90 0,90	0,27 0,45	30 50	6	—
C	0,580 0,547	θ 0,24	θ 45	8	FS (0,2 g)
C	0,772 0,731	0,485 0,229	63 31	8	—
C	0,774 0,731	0,322 0,349	41 52	8	—
C	0,774 0,731	0,697 0,634	87 88	$7^1/_2$	—
C	0,774 0,731	0,373 0,612	48 84	$7^1/_2$	—
C	0,697 0,619	0,135 θ	19 θ	$7^1/_2$	FS (0,14)
C	0,697 0,619	0,403 θ	58 θ	8	FS (0,72)
C	0,697 0,619	0,393 0,245	65 35	21	—
C	0,697 0,619	0,319 0,114	46 18	8	—
C	0,697 0,619	0,256 0,424	37 68	8	—

Messung in Anbetracht der Elastizität des Darmes nicht möglich war.

Nummer des Versuches	Kategorie des Versuches	Inhalt (ccm) der Darmschlinge	Lage der Darmschlinge	Länge[1] cm der Darmschlinge	Vorbehandlung
XXI.	Seife und Fettsäure	Ölsaures Na 1,2 Proz., 45	d	50	θ
		Ölsäure 1 Proz., 45	p	50	
XXII.		Ölsaures Na 1,2 Proz., 45	p	45	θ
		Ölsäure 1 Proz., 45	d	45	
XXIII.		Ölsaures Na 1,29 Proz., 45	p	45	θ
		Ölsäure 1,72 Proz., 45	d	45	
XXIV.	Seife und Neutralfett	Ölsaures Na 1,2 Proz., 45	d	55	θ
		Öl 0,8 Proz., 45	p	45	
XXV.		Ölsaures Na 1,2 Proz., 45	d	45	θ
		Öl 0,8 Proz., 45	p	45	
XXVI.	Neutralfett + Galle	Öl 0,75 Proz., 45	d	—	θ
		„ 0,75 „ $42^{1}/_{2}$ + G $2^{1}/_{2}$	p	—	
XXVII.		„ 1,90 „ 45	p	—	θ
		„ 1,90 „ $42^{1}/_{2}$ + G $2^{1}/_{2}$	d	—	
XXVIII.		„ 1,93 „ 45	p	45	D
		„ 1,93 „ $40^{1}/_{2}$ + G $4^{1}/_{2}$	d	45	
XXIX.		„ 1,93 „ 45	d	50	D
		„ 1,93 „ $40^{1}/_{2}$ + G $4^{1}/_{2}$	p	50	
XXX.	Neutralfett + Galle + Pankreas	„ 1,93 „ 45	p	55	θ
		„ 1,93 „ $40^{1}/_{2}$ + G $2^{1}/_{2}$ + PP $2^{1}/_{2}$	d	50	
XXXI.		„ 1,93 „ $42^{3}/_{4}$ + G $2^{1}/_{4}$	p	70	D
		„ 1,93 „ $40^{1}/_{2}$ + G $2^{1}/_{2}$ + PP $2^{1}/_{2}$	d	70	

Abkürzungen: G = Galle (Rind), PP = Pankreaspreßsaft (Rind), p = proxi-

Tier in einen sehr stark geheizten Raum (dessen Temperatur meist 25 bis 30° C betrug) gebracht, wo es sich stets bald erholte. Nach Ablauf der Versuchszeit wurde das Tier durch Chloroform getötet, der abgebundene Darm herauspräpariert, sein Inhalt in eine Schale entleert, mit Wasser wiederholt nachgespült; die Schlinge schließlich noch der Länge nach aufgeschnitten und abgestrichen.

Bei einer Reihe von Versuchen (in der Tabelle durch den Vermerk „D“ [Darmspülung] gekennzeichnet) wurde vor Einfüllung der Fettprobe die Darmschlinge an beiden Seiten mit weiten Kanülen versehen und gründlich ausgespült. Doch auch hier vermieden wir es, die Darmschlinge quer ganz zu durchschneiden und wählten den Ort der Incision derart, daß die am Mesenterialrande verlaufenden größeren Gefäße geschont wurden.

[1]) Siehe Fußnote von S. 466.

Methode	Eingeführte Menge	Resorbierte Menge		Dauer	Anmerkung
	g	g	Proz.	Stunden	
B	0,54 0,45	0,08 0,09	15 20	7	—
B	0,54 0,45	0 0	0 0	8	FS (0,22) FS (0,09)
C	0,580 0,774	0,196 0,404	34 52	8	—
B	0,54 0,36	0 0,09	0 25	6	FS (0,34)
B	0,54 0,36	0 0,04	0 11	16	—
C	0,34 0,32	0 0,15	0 54	22	FS (0,07)
C	0,855 0,807	0,630 0,531	71 68	8	—
C	0,868 0,782	0,517 0,632	60 82	7½	—
C	0,868 0,782	0,700 0,687	87 88	7½	—
C	0,868 0,782	0,323 0,178	37 23	8	—
C	0,824 0,782	0,552 0,605	67 77	8	—

mal und d = distal, D = Darmspülung, FS = Fettsekretion.

Wir injizierten stearinsaures und ölsaures Natron in Form wässeriger Lösungen, Olivenöl sowie reine Ölsäure in Form von Emulsionen, denen zum Zwecke größerer Haltbarkeit 5 Proz. Gummi arabicum zugesetzt worden war. Selbstverständlich wurde vor Entnahme der einzelnen Proben durch kräftiges Schütteln für eine gleichmäßige Emulgierung gesorgt.

Zur quantitativen Bestimmung der Seifen und Fettsäuren im Inhalt der Darmschlingen gingen wir bei den Versuchen mit stearinsaurem Natron derart vor, daß wir denselben nach Zusatz der mehrfachen Mengen Alkohols aufkochten, filtrierten, mit Alkohol nachwuschen, den Alkohol verjagten, die Fettsäuren durch Salzsäure in Freiheit setzten, wieder erhitzten, sodann erkalten ließen, die erstarrten Fettsäuren abfiltrierten, chlorfrei wuschen, auf dem lufttrockenen Filter in Äther lösten und nach Alkoholzusatz (mit Phenolphthaleïn als Indikator) mit $^{n}/_{10}$ NaOH titrimetrisch bestimmten (Methode A).

Eine Reihe weiterer Versuche wurde nach dem Vorgange Hamburgers[1]) derart ausgeführt, daß der Inhalt der Darmschlinge mit 10 g

[1]) l. c.

Sand und 20 ccm 10 proz. Salzsäure am Wasserbade eingetrocknet, der trockene Rückstand in einem mit gut eingeschliffenem Stopfen versehenen Zylinder mit 50 ccm Äther übergossen und unter zeitweiligem Schütteln einen Tag stehen gelassen wurde. Sodann wurden 25 ccm des klaren Äthers abgehoben, in ein breites Wägeglas übertragen, der Äther vertrieben, der Rückstand einen Tag bei 100° getrocknet und gewogen (Methode B).

Bei der Mehrzahl der Versuche verfuhren wir jedoch, um ganz sicher zu gehen, derart, daß wir den in einer Schale mit Sand nach Salzsäurezusatz am Wasserbade eingetrockneten Inhalt der Darmschlinge in eine Extraktionshülse übertrugen, die Schale wiederholt mit Äther, den wir sodann durch ein trockenes Filter in einen Extraktionsapparat gossen, nachspülten und die Fettbestimmung nach dem Soxhlet-Verfahren in der üblichen Weise zu Ende führten (Methode C).

Der (für die Seifenlösungen durch das Gewicht der freien Fettsäuren) ausgedrückte „Titer" unserer Standard-Lösungen wurde nach jenem Verfahren, das bei dem betreffenden Versuche zur Verwendung gelangte, durch wiederholte „blinde" Bestimmungen genau ermittelt, derart also, daß ein unmittelbarer Vergleich der in die Darmschlinge eingeführten und bei der Analyse wiedergewonnenen Menge von Neutralfett oder Fettsäure tatsächlich möglich war.

4. Ergebnisse.

Bei Durchsicht der Tabelle ergibt sich folgendes:

1. Stearinseife wurde außerordentlich schlecht resorbiert. In 18 Einzelversuchen (I bis IX) wurde nach Einführung von 0,6 bis 0,9 g nur fünfmal mehr als 20 Proz. resorbiert; in der Mehrzahl der Fälle war eine ganz geringfügige oder gar keine Resorption erfolgt; einigemale wurde sogar Fettsekretion in die Schlinge beobachtet.

2. Für Ölseife (ölsaures Natron) gilt ähnliches. In neun Einzelversuchen (mit 0,5 bis 0,9 g) viermal gar keine Resorption bzw. Fettsekretion, fünfmal Resorption von 15 bis 50 Proz. (Vers. X, XI, XXI bis XXV).

3. Ölsäure wurde offenbar ungleich besser resorbiert. In 21 Einzelversuchen (mit 0,4 bis 0,8 g) wurde nur dreimal jegliche Resorption vermißt (davon zweimal nach Zusatz von Pankreaspreßsaft s. u.), sechsmal betrug sie 18 bis 40 Proz., zwölfmal über 40 Proz. innerhalb 7 bis 8 Stunden (Vers. XII bis XXIII). Die schnellere Resorption der Ölsäure (der Ölseife gegenüber) machte sich auch im Doppelversuche XXIII geltend.

4. Ebenso wurde Olivenöl weit besser resorbiert als Ölseife. In 14 Einzelversuchen mit 0,3 bis 0,9 g war in einem einzigen Falle gar keine Resorption zu bemerken und neunmal betrug sie über 50 Proz. (Vers. XXIV bis XXXII).

5. Die Resorption der Seifen wurde durch Glycerinzusatz nicht in eindeutiger Weise und etwa in dem Sinne beeinflußt, wie es nach den Versuchen von Will[1]) an überlebenden Froschdärmen hätte erwartet werden können (zwei negative und ein positiver Doppelversuch [VIII bis X]).

6. Die Resorption von Stearinseife wurde durch Gallenzusatz (Vers. I bis VII) eher ungünstig, als günstig beeinflußt (Darmreizung! Übereinstimmung mit Bleibtreu[2]). Bei einem Doppelversuche mit ölsaurem Natron (XI) war allerdings eine eklatante Resorptionsbegünstigung in der gallenhaltigen Schlinge bemerkbar, insofern darin 50 Proz. der Seife resorbiert worden war, während in der gallenfreien Kontrollschlinge überhaupt keine Resorption stattgefunden hatte.

7. Eine regelmäßige Begünstigung der Resorption freier Ölsäure durch Gallenzusatz war nicht wahrnehmbar (Vers. XII bis XV; drei Versuche negativ oder zweifelhaft, ein Versuch positiv).

8. Ebensowenig ließ sich eine solche Begünstigung für Olivenöl regelmäßig feststellen (XXVII bis XXIX; zwei positive und ebensoviel negative Versuche).

9. Wurde der Ölsäure oder dem Olivenöl außer Galle auch noch Pankreaspreßsaft zugesetzt, so wurde die Resorption im allgemeinen dadurch merklich verschlechtert (Vers. XVI bis XIX, XXXI; Vers. XXXII ist zweifelhaft, in Vers. XX Ausschlag im umgekehrten Sinne). Die durch Pankreaspreßsaft hervorgerufene ungünstige Beeinflussung der Resorption war offenbar durch Darmreizung und Auslösung einer Fettsekretion bedingt.

10. Auch in den durch Ausspülung von Galle und Pankreassekreten befreiten Darmschlingen erfolgte die Resorption von Olivenöl keineswegs wesentlich schlechter als sonst (Vers. XXVIII, XXIX).

11. Nimmt man an, daß das Aufnahmevermögen des normalen Katzendarms etwa demjenigen des Hundedarms entspricht[3]) und beachtet man, daß bei unseren Versuchen der größte Teil des freien Dünndarms nahezu in seiner ganzen Ausdehnung vom Duo-

---

[1]) A. Will, Pflügers Arch. 20, 255 (1879).
[2]) l. c.
[3]) C. Voit hat festgestellt, daß Hunde selbst bei Aufnahme von 150 bis 200 g Fett fast die Gesamtmenge desselben (99 Proz.) zu resorbieren und auszunutzen vermögen.

denum bis in die Nähe der Ileocoecalklappe in Anspruch genommen war, so gelangt man zur Erkenntnis, daß die hier (ebenso wie die von früheren Beobachtern bei analogen Versuchen) erzielte Resorptionsleistung eine sehr geringe war und nur einem kleinen Bruchteile der normalen physiologischen Leistung des Darmes entspricht.

Wir glauben daher, daß, solange es nicht gelungen ist, durch bessere Versuchsbedingungen die resorptive Leistung isolierter Darmschlingen auf ein Vielfaches des bisherigen Effektes zu erhöhen, physiologische Schlußfolgerungen auf die Vorgänge im normalen Darme aus derartigen Experimenten nur mit allergrößter Vorsicht gezogen werden dürfen.

Wien, Juli 1907.

XXVIII.

Über Phlorizindiabetes.

Von Dr. **K. Glaessner** und Priv.-Doz. Dr. **E. P. Pick.**

Aus dem k. k. serotherapeutischen Institut (Vorstand: Prof. Dr. R. Paltauf) und dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolfstiftung" (Vorstand: Dr. E. Freund) in Wien.

Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

Seit der Entdeckung der Fähigkeit des Phlorizins, Glykosurie zu erzeugen, die wir v. Mering verdanken, sind 20 Jahre verflossen. Trotz der großen Anzahl von Arbeiten, die sich mit der Erforschung dieser rätselvollen Stoffwechselstörung befaßten, ist eine Reihe von Fragen, darunter die nach dem Zustandekommen der Phlorizinglykosurie und nach der Quelle des zur Ausscheidung gelangenden Zuckers noch nicht endgültig beantwortet. Es waren deshalb im wesentlichen diese zwei Probleme, die uns zur Bearbeitung der Phlorizinvergiftung veranlaßten. Ohne daß es uns gelang, sie in ausreichender Weise zu lösen, lernten wir doch einige nicht uninteressante neue Seiten der Phlorizinglykosurie kennen, deren Mitteilung uns nicht ganz unwichtig erscheint.

1. Beeinflussen Aminosäuren die Größe der Zuckerausscheidung?

Seit F. Müller bei der Bildung des Zuckers aus dem Eiweißmolekül an die Mitwirkung der Aminosäuren gedacht und dabei namentlich das Leucin, das unter den Aminosäuren vermöge seiner Kohlenstoffzahl den Zuckern am nächsten steht, berücksichtigt hat, sind eine Reihe von Forschern dieser Frage nachgegangen, ob die Aminosäuren bei der Bildung des Zuckers eine Rolle spielen bzw. ob z. B. beim diabetischen Organismus Aminosäuren die Zuckerausfuhr steigern. Durch die Versuche R. Cohns und Halseys

fand zunächst Müllers Anschauung eine Stütze. Diese Autoren konnten Glykogenvermehrung nach Leucinfütterung nachweisen, was indes von Simon bestritten wurde. Ferner hat F. Kraus an mit Phloretin vergifteten Katzen durch Zufuhr von Alanin eine deutliche Steigerung der Zuckerausscheidung beobachten können. An pankreaslosen Hunden haben Lüthje und Nebelthau ähnliche Experimente mit gleichem Resultate angestellt. Der erstere konstatierte beim pankreaslosen Hunde nach Verfütterung von Pankreas das Auftreten einer erhöhten Zuckerausscheidung, die er auf die Wirkung der Eiweißspaltungsprodukte der Pankreasverdauung bezieht. Nebelthau fand, daß Einverleibung von Asparagin und Acetamid per os beim Hunde, welchem das Pankreas vollständig oder bis auf ein Minimum entfernt worden war, eine beträchtliche Vermehrung der Zuckerausscheidung hervorrief, besonders dann, wenn gleichzeitig Milcheiweiß gereicht wurde. Dahin gehören ferner die Versuche Mohrs, der durch Verfütterung von Leucin und Tyrosin bei schweren Diabetikern eine Vermehrung der Zuckerausfuhr hervorrief, und die Beobachtung von Langstein und Neuberg, daß bei glykogenfrei gemachten Kaninchen die Ernährung mit Alanin den Glykogengehalt der Leber erhöht. Ferner zeigte Knopf, daß bei Hunden, die mit Phlorizin dauernd glykosurisch gemacht worden waren, Darreichung von 50 g Asparagin eine beträchtliche Erhöhung der Glykosurie (um 15 g) zur Folge hat. Embden und Salomon endlich gelang es, bei pankreaslosen Tieren den sicheren Nachweis zu erbringen, daß nach Verabreichung von Alanin die Zuckerausscheidung in die Höhe schnellt. In späteren Versuchen zeigte auch Milchsäure, Glykokoll und Asparagin bei pankreaslosen Tieren die gleiche Wirkung, während sie der als Kontrollpräparat verwandte Harnstoff vermissen ließ.

Unsere eigenen Versuche, die sich an jene Knopfs anschließen, zerfallen in zwei Gruppen, in Versuche am gefütterten und am Hungertier.

A. Versuche am normalen Tiere.

Zur Verwendung kamen Kaninchen, die ja, wie wir seit den Mitteilungen von Cremer und Ritter wissen, für Phlorizin auch empfänglich sind, wenn auch in weit geringerem Maße als andere Tiere (Katze, Hund).

Die Tiere wurden unter konstanter Phlorizinwirkung gehalten, bis die Zuckerausscheidung einen bestimmten, wenig schwankenden Wert angenommen hatte, dann wurde die entsprechende Amino-

säure meist subcutan beigebracht. Die orale Darreichung der Substanzen wurde seltener angewendet, da die Resorption vom Magen und Darmkanal aus nicht so rasch und so vollständig erfolgt, wie bei direkter Einbringung ins Blut. Um im übrigen die Resorption der verabreichten stickstoffhaltigen Körper zu kontrollieren, wurde neben der Zuckerbestimmung im Urin auch die Stickstoffbestimmung durchgeführt.

Versuch I. Leucin.

Tag	Phlorizinmenge g	Leucin g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt des Urins g	N-Gehalt des Urins g
1. . . .	1	—	200 (aufgefüllt)	2,86	0,66
2. . . .	1	2	200 (aufgefüllt)	2,86	0,56
3. . . .	1	—	200 (aufgefüllt)	4,84	0,714

Da die Resorption des Leucins langsam vor sich ging, so war erst am Tage der Nachperiode ein deutlicher Ausschlag ersichtlich.

Versuch II. Pepton.

Tag	Phlorizin g	Pepton	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	3,52	1,96
2. . . .	1	20 ccm 10 proz. Lösung	200	3,52	0,95
3. . . .	1	—	200	3,08	1,316

Hier sehen wir eine Herabsetzung des N-Wertes im Harn, an der Zuckerausscheidung wird durch die Peptonzufuhr nichts geändert.

Versuch III. Rinderserum.

Tag	Phlorizin g	Serum ccm	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	2,4	0,58
2. . . .	1	20	200	3,3	0,48
3. . . .	1	—	200	2,84	0,65

Rinderserum hat einen deutlichen Einfluß auf die Zuckerausscheidung, die Ausscheidung des Stickstoffs erfolgt etwas verspätet (erst am Tage der Nachperiode).

Versuch IV. Alanin.

Tag	Phlorizin g	Alanin g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	4,84	0,714
2. . . .	1	5	200	8,18	1,316
3. . . .	1	—	200	6,60	1,078

Alanin ruft eine Steigerung der Zuckerausscheidung um fast das Doppelte hervor.

Versuch V. Asparagin.

Tag	Phlorizin g	Asparagin g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	3,08	1,31
2. . . .	1	5	200	2,42	2,74
3. . . .	1	—	200	4,40	1,68
4. . . .	1	—	200	3,08	1,44

Asparagin wirkt auf die Zuckerausscheidung erhöhend, jedoch tritt der Effekt auf die Glykosurie später auf als die N-Ausscheidung, die sofort einsetzt.

Versuch VI. Glykokoll.

Tag	Phlorizin g	Glykokoll g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	2,92	0,53
2. . . .	1	5	200	1,54	1,06
3. . . .	1	—	200	4,40	1,05
4. . . .	1	—	200	1,76	0,27

Auch Glykokoll wirkt zuckertreibend, auch hier erst am Tage der Nachperiode, ähnlich wie das Asparagin, der N-Gehalt des Urins ist in der Haupt- und Nachperiode deutlich erhöht.

Versuch VII. Glutaminsäure.

Tag	Phlorizin g	Glutaminsäure g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	3,3	0,574
2. . . .	1	5	200	5,72	0,840
3. . . .	1	—	200	2,64	0,784

Glutaminsäure bewirkt prompte Erhöhung der Zucker- und Stickstoffausscheidung.

Mit Rücksicht auf die Versuche Nebelthaus wurde den Tieren noch Acetamid, mit Rücksicht auf die Ausschläge der Zuckerausscheidung in der Arbeit von Embden und Salomon auch Milchsäure beigebracht.

Versuch VIII. Acetamid.

Tag	Phlorizin g	Acetamid g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	3,96	0,966
2. . . .	1	5	200	3,74	0,784
3. . . .	1	—	200	3,08	1,554

Acetamid hat nicht die geringste Beeinflussung der Zuckerausscheidung zur Folge.

Versuch IX. Milchsaures Natron.

Tag	Phlorizin g	Milchsaures Natron g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	200	2,64	0,896
2. . . .	1	5	200	2,64	0,861
3. . . .	1	—	200	3,96	0,973

Milchsaures Natron hat eine mäßige Erhöhung der Zuckerausscheidung zur Folge, doch steigt gleichzeitig nach Darreichung dieses stickstofffreien Körpers die N-Ausscheidung, so daß eine Art Ausschwemmung des Zuckers nicht ganz von der Hand zu weisen ist.

Da die NH_2-Gruppe im Acetamid an einer anderen Stelle, als man sie bei Aminosäuren findet, nicht wirksam war, die Wirkung der Milchsäure sich als nur geringfügig erwies, so wurde einem Tiere Glykokoll und milchsaures Natron beigebracht, um eventuell die Wirksamkeit der Milchsäure durch Hinzufügen einer Aminosäure zu erhöhen.

Versuch X. Glykokoll und milchsaures Natron.

Tag	Phlorizin g	Glykokoll g	Milchsaures Natron g	Zuckergehalt g	N-Gehalt g
1. . . .	1	—	—	3,30	—
2. . . .	1	5	5	1,76	0,798
3. . . .	1	—	—	3,30	0,574

Im Gegensatz zu der oben geäußerten Vermutung fiel der Versuch negativ aus.

Daß bei den mitgeteilten Versuchen die bloße diuretische Wirkung der injizierten Aminosäuren auszuschließen war, beweist ein Experiment, bei welchem zur Erzielung einer Harnflut Chloralhydrat mit Coffeïn injiziert wurde.

Versuch XI. Chloralhydrat und Coffeïn.

Tag	Phlorizin g	Chloral-hydrat g	Coffeïn g	Zucker-gehalt g	N-Gehalt g	Harn-menge ccm
1. . . .	1	—	—	2,66	0,756	50
2. . . .	1	0,3	0,3	2,86	1,456	160
3. . . .	1	—	—	3,0	0,682	60

Die bloße harntreibende Wirkung hat, wie aus dieser Tabelle hervorgeht, gar keinen Einfluß auf die Größe der Zuckerausscheidung.

Nach den vorliegenden Versuchen scheint die Schlußfolgerung berechtigt, daß neben dem Serum, das geringe Wirksamkeit entfaltet, eine Reihe von Aminosäuren die Zuckerausfuhr beim Phlorizindiabetes zu steigern imstande ist[1]). Es wirken Alanin, Glykokoll, Asparagin fast gleich stark, etwas schwächer Glutaminsäure und Leucin. Milchsaures Natron hat geringe Wirkung. Es versagt die Wirkung bei Zufuhr von Acetamid und bei harntreibenden Agentien wie Coffeïn und Chloralhydrat. Somit müssen wir den Schluß ziehen, daß beim gefütterten phlorizinglykosurischen Tiere (Kaninchen) die Aminosäuren deutlich steigernd auf die Zuckerausscheidung wirken. Diese Wirkung ist zum Teil auf die stickstofffreien Gruppen zurückzuführen, wie ein Versuch mit Milchsäure beweist, jedenfalls aber ist die Stellung der Aminogruppe von Wichtigkeit, wie aus dem negativen Ausfall des Acetamidversuchs hervorgeht. Daß es nicht bloß harntreibende Wirkungen sind, erscheint durch den diuretischen Versuch bewiesen.

[1]) In jüngster Zeit ist eine Mitteilung von Baer und Blum: „Über die Einwirkung chemischer Substanzen auf die Zuckerausscheidung und Acidose“ [diese Beiträge 10, 80 (1907)] erschienen, in welcher die Autoren zum Teil zu ähnlichen Schlüssen kommen, wie wir. Es sei uns der Hinweis gestattet, daß unsere Versuche im wesentlichen bereits im September 1905 auf der Naturforscherversammlung in Meran mitgeteilt wurden. Siehe Verh. Deutscher Naturforscher u. Ärzte, Meran 1905, S. 411.

B. Versuche am Hungertier.

Versuch I. Glutaminsäure.

Ein Kaninchen wurde nach achttägigem Hungern mit Phlorizin injiziert und weiterhin unter ständiger Phlorizinwirkung gehalten.

Tag	Phlorizin g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g	Injiziert g
1. . . .	1	40	0,44	0,336	—
2. . . .	1	40	0,44	0,364	5 Glutaminsäure
3. . . .	1	120	0,52	2,24	—

Glutaminsäure scheint gar keinen Einfluß auf die Zuckerkurve beim Hungertier zu haben, trotzdem die Resorption, wie aus der Stickstoffkurve hervorgeht, eine vollständige ist.

Versuch II. Alanin.

Ein Kaninchen wurde nach achttägigem Hungern unter ständige Phlorizinwirkung gesetzt.

Tag	Phlorizin g	Harnmenge ccm	Zuckergehalt g	N-Gehalt g	Injiziert
1. . . .	1	80	1,54	1,372	—
2. . . .	1	120	2,64	2,156	5 g Alanin
3. . . .	1	40	2,86	0,672	—

Alanin hat eine nicht übermäßig hohe Zuckersteigerung im Urin zur Folge, die der Steigerung in der Stickstoffausfuhr entspricht.

Es wirken also, wie aus den beiden Beispielen ersichtlich, auf Hungertiere die Aminosäuren in viel schwächerem Maße ein. Die bei gefütterten Tieren weniger wirksame Glutaminsäure versagt hier vollständig, während das bei normalen Tieren am stärksten wirkende Alanin einen nur geringfügigen Effekt hat. Ob dabei der Mangel an Glykogen von Einfluß ist, oder ob der hungernde Organismus die nicht stickstoffhaltigen Anteile der Aminosäuren stärker retiniert als der gefütterte, kann nach diesen Versuchen nicht sicher entschieden werden.

Während Almagia und Embden bei ihren pankreaslosen Hungertieren nach Alaninzufuhr noch Steigerung der Zuckerausscheidung konstatieren konnten, finden wir einen Versuch bei

R. Hirsch, der bei seinem mit Phlorizin vergifteten Hungertier nach Alaninverfütterung gar keinen Ausschlag erzielen konnte. Der erstere Befund würde mit unseren Ergebnissen in Parallele zu bringen sein.

2. Über den Angriffsort des Phlorizins.

v. Mering, der Entdecker des Phlorizindiabetes, hat bekanntlich die Wirkung des Giftes so erklärt, daß unter dem Einfluß desselben die Niere für Zucker leichter durchgängig werde. Minkowski, der sich im wesentlichen der Ansicht v. Merings anschloß, entwickelte in weiterer Folge eine viel bekämpfte Anschauung, daß die Wirkung des Phlorizins so zu verstehen sei, daß das Glykosid in Phloretin und Glykose zerfalle, die Glykose ausgeschieden werde, während das Phloretin sich neuerdings mit dem Blutzucker verbinde und so eine längere Zeit dauernde Glykosurie zustande käme. Neben anderen Gründen spricht gegen die Richtigkeit seiner Theorie vor allem die jetzt bekannt gewordene Tatsache, daß das Phlorizin unverändert zur Ausscheidung gelangt (Cremer, Yokota). Er hat denn auch später selbst seine Anschauungen modifiziert.

Einen weiteren Wendepunkt in der Erkenntnis der Phlorizinwirkung bedeutet unstreitig der geistvolle Versuch von Zuntz, der nach Injektion von Phlorizin in die Arterie einer Niere aus dem Ureter dieser Niere früher Zucker im Harn auftreten sah als aus dem Ureter der Niere der anderen Seite. Die letzte bedeutsame Arbeit über das schwierige Problem verdanken wir Pavy, Brodie und Siau; diese Autoren konnten in erster Linie den Zuntzschen Versuch durchaus bestätigen. In weiteren Versuchen fanden sie, daß bei künstlicher Durchblutung von Nieren mit defibriniertem Blut, dem Phlorizin zugesetzt worden war, im Harn (bzw. Sekret) der durchbluteten Niere mehr Zucker auftrete, als durch die Abnahme des Blutzuckers erklärt werden könne. Sie geben der Meinung Ausdruck, daß die Niere unter dem Einfluß des Phlorizins imstande sei, aus spezifischen Eiweißkörpern des Blutes, die zuckerbildende Gruppen besäßen, die Glykose abzuspalten und machen den treffenden Vergleich mit der Bildung des Milchzuckers in den Milchdrüsen, woselbst ja ein ähnlicher, vielleicht fermentativer Prozeß verläuft. Ferner beobachteten sie nach Ausschaltung aller Organe, wenn nur die Niere erhalten und durchblutet war, am Hunde durch Phlorizin erzeugte Glykosurie; sie konnten somit die Bedeutung anderer Organe für die Entstehung des Phlorizindiabetes vernach-

lässigen, wobei allerdings bemerkt werden muß, daß die Autoren recht geringe Zuckerwerte — sowohl bei Durchblutung der Nieren als am eviscerierten Tiere — erhielten, so daß eine Revision dieser Versuche nicht von der Hand zu weisen wäre. Endlich machten sie die interessante Beobachtung, daß nach Evisceration beim Hunde unter dauernder Phlorizinwirkung Zufuhr von frischem defibriniertem Blut in das Gefäßsystem die schon stark gesunkene Glykosurie aufs neue in die Höhe schnellen ließ.

Überblicken wir die genannten Theorien und Versuche, so erscheint vor allem die Ansicht, daß die Niere nur eine größere Permeabilität für den Blutzucker annehme, nicht ganz mit den Tatsachen vereinbar. Daß der Zucker aus den Eiweißkörpern der Niere selbst stammt, erscheint ebenfalls aus rein rechnerischen Gründen nicht sehr wahrscheinlich. Aber auch bei Durchsicht der Pavyschen Versuche bleibt die Möglichkeit offen, daß der Zucker beim Phlorizindiabetes nicht erst in der Niere gebildet wird, so daß der Angriffspunkt des Giftes doch noch in ein anderes Organ oder in das Blut selbst verlegt werden könnte.

Wir haben deshalb eine Reihe von Versuchen angestellt, um uns über den Ort, wo das Phlorizin im Tierkörper angreift, zu orientieren und so vielleicht Anhaltspunkte über die Natur des Phlorizindiabetes zu gewinnen. Zu diesem Zweck bedienten wir uns der biologischen Methode des Phlorizinnachweises, indem wir festzustellen versuchten, welches Organ nach einer Phlorizinvergiftung am meisten oder vorwiegend das Gift gebunden enthält.

A. Versuche an normalen Tieren.

Zuerst wurden die Experimente in der Weise angestellt, daß wir Kaninchen mit einer bestimmten Menge Phlorizin vergifteten, und sobald wir uns von der Resorption des Giftes durch das erste Auftreten von Zucker im Harn überzeugt hatten, das Blut und die Organe dieser Tiere anderen Tieren injizierten und nun bei diesen wiederum die Giftwirkung mit Hilfe der Glykosurie nachzuweisen suchten.

Versuch I. Blut (Kaninchen).

18. IV. 4 Uhr 30 Min. nachmittags. Ein Kaninchen wird mit 2 g Phlorizin (subcutan) vergiftet, um 7 Uhr abends nach Auftreten der ersten Zuckerreaktion im Harn getötet, das Blut (30 ccm) defibriniert und einem zweiten Kaninchen subcutan injiziert. Der Harn des zweiten Tieres zeigte folgendes Verhalten:

Tag	Harn (Tagesmenge) ccm	Zuckergehalt g
1.	205	0,44
2.	100	—

Versuch II. Blut (Kaninchen).

3. V. 8 Uhr morgens 2 g Phlorizin injiziert, 3 Uhr 15 Min. entblutet; das defibrinierte Blut (25 ccm) einem zweiten Kaninchen subcutan beigebracht.

Tag	Harn ccm	Zuckergehalt g
1.	70	0,66
2.	45	—

Mit Rücksicht auf die geringe Wirkung bei subcutaner Einverleibung wurde das Blut in den folgenden Versuchen intraperitoneal zugeführt.

Versuch III. Blut (Kaninchen).

8. V. 2 Uhr nachmittags 2 g Phlorizin injiziert. 4 Uhr 30 Min. nachmittags: der gelassene Harn gibt reichliche Zuckerreaktion. Das Kaninchen wird entblutet, das Blut in 2 ccm einer Oxalatlösung (4 proz.) aufgefangen, und die Gesamtmenge (40 ccm) einem zweiten Tiere intraperitoneal beigebracht.

Tag	Harn ccm	Zuckergehalt g	Bemerkungen
1.	15	0,66	erst Krämpfe, dann erholt sich das Tier.
2.	40	0,88	normal
3.	50	—	„

Versuch IV. Blut (Kaninchen).

8. V. 2 Uhr nachmittags 2 g Phlorizin injiziert. 7 Uhr 15 Min. abends entblutet, das gesamte in 2 ccm einer 4 proz. Oxalatlösung aufgefangene Blut einem zweiten Tiere injiziert.

Tag	Harn ccm	Zuckergehalt g
1.	42	0,1
2.	nicht gemessen	—

Versuch V. Blut (Kaninchen).

12. V. 11 Uhr vormittags 2 g Phlorizin injiziert. 7 Uhr 15 Min. wird das Tier getötet, das gesamte in Oxalatlösung aufgefangene Blut einem zweiten Tiere intraperitoneal beigebracht.

Tag	Harn ccm	Zuckergehalt g
1.	60	0,88
2.	200 ?	—

Versuch VI. Blut (Kaninchen).

22. V. 1 Uhr mittags 5 g Phlorizin injiziert; das Tier wird 4 Uhr 30 Min. nachmittags getötet, das in Oxalatlösung aufgefangene Blut (50 ccm) einem zweiten Tiere intraperitoneal beigebracht.

Tag	Harn ccm	Zuckergehalt g
1.	50	0,4
2.	48	0,4
3.	?	—

Die Größe der Phlorizingabe scheint demnach von geringer Bedeutung zu sein, da in einzelnen Versuchen selbst 5 g Phlorizin keinen viel größeren Ausschlag hervorriefen als 2 g. Daß das Oxalat als solches unter sonst gleichen Bedingungen keine Glykosurie erzeugt, konnten wir durch Kontrollversuche sicherstellen, ebenso gelang es, nachzuweisen, daß das Phlorizin bei längerem Stehen mit Blut oder Blutserum seine Wirksamkeit nicht einbüßt. Aber auch Injektionen von in Blut und Blutserum gelöstem Phlorizin haben wir zur Kontrolle ausgeführt und schon bei intraperitonealer Einverleibung von 0,5 g Phlorizin mit 50 ccm Rinderserum deutliche Glykosurie erhalten (0,5 Proz.).

Da Kaninchen gegen Phlorizin weniger empfindlich sind als Hunde, haben wir an diesen für Phlorizinversuche besonders geeigneten Tieren einige Versuche in dem oben angedeuteten Sinne ausgeführt.

Es wurden Kaninchen mit Phlorizin vergiftet und nach dem Auftreten der ersten Zuckermengen im Harn wurden die Tiere entblutet, und das Blut (defibriniert), die Leber und Nieren Hunden subcutan injiziert. Um die Versuche reiner zu gestalten und eine bessere Resorption zu gewährleisten, wurde die Versuchsanordnung später derart eingerichtet, daß den Hunden nicht Blut bzw. Organbrei

als solche injiziert wurden, sondern die eingedampften und in schwach alkalischem Wasser gelösten Rückstände von Alkoholextrakten des Blutes und der frisch zerriebenen Organe. Das Phlorizin geht, wie wir uns selbst überzeugen konnten, quantitativ in die alkoholischen Lösungen, und es mußte daher bei Gegenwart von freiem Phlorizin die Glykosurie bei den injizierten Hunden prompt auftreten.

Versuch VII.

Ein Kaninchen erhält um $^1/_2$ 11 Uhr 2 g Phlorizin subcutan und wird $^1/_2$ 1 Uhr getötet. Das Blut des Tieres wird defibriniert, mit Alkohol extrahiert, der Alkohol abfiltriert, eingeengt und der Rückstand in schwache Sodalösung aufgenommen. Diese Lösung wird einem Hunde subcutan beigebracht; der Harn des Hundes zeigt einen Zuckergehalt von 1,1 Proz. = 3,3 g (entsprechend 300 g Harn).

Die Leber wurde unter Zusatz von Quarzsand zerrieben, mit Alkohol extrahiert und wie beim Blute verfahren. Der Harn desselben Hundes ergibt nach Injektion der Leberlösung 0,3 Proz. Zucker = 2 g (entsprechend 600 ccm Harn).

Das Nierenextrakt (in gleicher Weise gewonnen) bewirkte an dem gleichen Tiere eine Glykosurie von 0,66 Proz. = 1,5 g (bei 250 ccm Harn).

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Phlorizin beim normalen Tiere mit dem Blute kreist und in den Organen enthalten ist, daß ferner seine physiologische Wirkung sowohl im defibrinierten Blute, wie auch in den Organextrakten durch das Tierexperiment nachweisbar bleibt.

B. Versuche an nephrektomierten Tieren.

Da der Phlorizindiabetes insbesondere seit den Versuchen von Zuntz als Nierendiabetes aufgefaßt wird, und auch die neueren Forschungsergebnisse auf die wichtige Rolle der Niere bei dieser Glykosurie hinweisen, schien uns die Versuchsanordnung gerechtfertigt, nach Entfernung der Nieren die Schicksale des Phlorizins zu verfolgen. In den oben angeführten Versuchen konnte gezeigt werden, daß das Phlorizin durch seine spezifische Wirkung im Blute und in den Organen der vergifteten Tiere mit Sicherheit nachweisbar ist; andererseits ist seit den Versuchen von Cremer, Yokota u. a. bekannt, daß das Phlorizin quantitativ und wahrscheinlich unverändert den Körper durch den Harn verläßt. Es war daher zu erwarten, daß beim nephrektomierten Tiere das Phlorizin, falls dessen alleiniger Angriffspunkt in der Niere gelegen ist, oder die Niere an sich durch das Phlorizin beeinflußt wird, quantitativ

und unverändert in den Organen und im Blute nachzuweisen ist. Über den Einfluß der Nierenexstirpation auf die Phlorizinwirkung liegen nun mehrere Beobachtungen vor, z. B. der Versuch Minkowskis, welcher lehrt, daß der Blutzucker nach Nierenexstirpation nicht ansteigt, ohne daß es andererseits, wie Löwi zeigte, zu größerer Glykogenansammlung in Muskeln oder Leber käme; ferner gehört hierher die Mitteilung Lewandowskys, daß Aderlässe, welche bei normalen Tieren Hyperglykämie hervorrufen, bei Phlorizintieren dieselbe nur nach Nephrektomie erzeugen. Diese Angaben legten die Vermutung nahe, daß sich das Phlorizin bei nephrektomierten Tieren anders verhalte als bei normalen. Wir prüften daher, ob das Phlorizin auf seinem Wege zur Niere Veränderungen erfährt.

Versuch I.

11 Uhr 20 Min. vormittags wurden einem Kaninchen beide Nieren extraperitoneal exstirpiert und darauf 2 g Phlorizin (subcutan) injiziert.

Das Tier wurde um 4 Uhr 30 Min. nachmittags durch Entbluten getötet, das Blut defibriniert und einem zweiten Kaninchen die gesamte Blutmenge subcutan beigebracht.

Der Harn der nächsten 24 Stunden enthält keinen Zucker. Die Leber des nephrektomierten Tieres wird mit sodahaltiger Kochsalzlösung und Quarzsand zerrieben und das Extrakt einem Kaninchen subcutan injiziert. Der Harn des Tieres enthält ebenfalls keinen Zucker.

Da Kaninchen, wie oben bemerkt, gegen geringe Phlorizingaben viel weniger empfindlich sind, als Hunde, wurden die weiteren Versuche derart angestellt, daß das Blut und die Organextrakte der nephrektomierten Kaninchen Hunden subcutan beigebracht wurden.

Versuch II.

Einem Kaninchen werden um $^1/_2$4 Uhr nachmittags beide Nieren exstirpiert und 1 g Phlorizin subcutan injiziert. Am nächsten Tage um 12 Uhr mittags wird das Kaninchen entblutet und das in Oxalat aufgefangene Blut (40 ccm) einem Hunde subcutan injiziert.

Harn des Hundes. 1. Tag: Zucker fehlt
" " " 2. " " "
(Polarisation = —0,5 Proz.)

Versuch III.

Einem Tiere (Kaninchen) werden um 12 Uhr beide Nieren exstirpiert, dann 2 g Phlorizin injiziert. Um $^1/_2$3 Uhr wird das Tier getötet, das in oxalsaurem Natron aufgefangene Blut (50 ccm) einem Hunde subcutan injiziert: Der Harn des Hundes (Tagesmenge) zeigt keinen Zucker.

Versuch IV.

Um 1 Uhr wird bei einem Kaninchen die Nierenexstirpation vorgenommen und demselben 3 g Phlorizin subcutan injiziert; um 6 Uhr wird das Tier entblutet (Oxalatblut), das Blut (20 ccm) einem Hunde subcutan beigebracht.

Harn des Hundes.	1. Tag }	Menge 600 ccm, Zucker = 1 Proz. = 6 g
„ „ „	2. „ }	
„ „ „	3. „	Zuckerfrei.

Der Leberbrei desselben Kaninchens wird in der Menge von 60 ccm einem zweiten Hunde subcutan beigebracht.

Harn des Hundes.	1. Tag }	Menge 200 ccm, Zucker fehlt (Linksdrehung)
„ „ „	2. „ }	
„ „ „	3. „	Zuckerfrei.

Die hier angeführten Versuche wurden in der gleichen Weise wiederholt mit demselben Ergebnis angestellt; es zeigte sich nämlich konstant, daß Mengen bis zu 3 g Phlorizin, welche nephrektomierten Kaninchen beigebracht worden waren, weder im Blute noch in der Leber durch die glykosurische Wirkung beim Hunde nachweisbar waren. Dosen von 3 g und darüber riefen schon Glykosurie beim Hunde hervor.

Dieses überraschende Ergebnis konnte kaum durch die Annahme erklärt werden, daß das in den beigebrachten Flüssigkeiten enthaltene Phlorizin nicht genügend resorbiert worden war, da wir ja aus den Versuchen von Moritz und Prausnitz, sowie von Löwi wissen, daß schon Spuren von Phlorizin bei Hunden Glykosurie erzeugen. Andererseits konnte der Einwand, daß die nephrektomierten Kaninchen früher getötet worden waren, als die Resorption des gesamten injizierten Phlorizins stattgefunden hatte, dadurch entkräftet werden, daß die Kaninchen 24 Stunden und darüber in den vielfach variierten Versuchen nach Exstirpation der Nieren am Leben gelassen wurden. Man mußte sich also der Annahme zuneigen, daß das Phlorizin in dem der Nieren beraubten Organismus derart verändert worden war, daß es sich physiologisch als unwirksam erwies, und es lag daher die Notwendigkeit vor, mit Hilfe anderer Methoden die Abwesenheit des Phlorizins in den betreffenden Versuchen nachzuweisen.

Zu diesem Behufe versuchten wir einerseits das Phlorizin aus den Organen und aus dem Blute der nephrektomierten Tiere durch Alkoholextraktion zu gewinnen, andererseits dasselbe mit Hilfe der äußerst empfindlichen Salzsäure-Vanillinprobe nachzuweisen. Was die letzterwähnte Probe betrifft, so überzeugten wir uns, daß ihre

Empfindlichkeit eine sehr bedeutende ist. Es zeigte sich, daß noch 0,0002 g Phlorizin eine deutliche Reaktion gaben.

Die Extraktion des Phlorizins aus dem Blute und der Leber der entnierten Kaninchen fand nach der im vorigen Abschnitt geschilderten Methode statt (S. 484, Versuch VII).

Versuch V.

$^1/_2$ 11 Uhr vormittags Nierenexstirpation am Kaninchen und Injektion von 2 g Phlorizin. Den nächsten Tag um $^1/_2$ 11 Uhr vormittags Entblutung. Das alkoholische Extrakt des Blutes wurde eingedampft, der Rückstand in alkalischem Wasser gelöst (10 ccm) und die Flüssigkeit einem Hunde subcutan beigebracht. Die Vanillin-Salzsäurereaktion war negativ; der Harn des Hundes zeigte keinen Zucker.

Die Leber wurde in derselben Weise verarbeitet und injiziert. Das Leberextrakt gab keine Vanillinreaktion; der Harn des Hundes gab keine Zuckerreaktion.

Versuch VI.

Wie Versuch V, nur wurden 3 g Phlorizin injiziert. Das Leberalkoholextrakt gab diesmal positive Vanillinreaktion. Der Harn des injizierten Hundes enthielt am ersten Tage 8 Proz., am zweiten Tage 1,5 Proz. Zucker.

Diese zwei Versuche mögen hier aus einer größeren Reihe gleichartiger Versuche herausgegriffen werden; alle haben übereinstimmend die vorhin erwähnte Annahme bestätigt, daß tatsächlich im nephrektomierten Tiere das Phlorizin in Dosen bis zu 3 g sich derart verändert, daß es sich dem physiologischen und chemischen Nachweise entzieht.

Es stand noch die Möglichkeit offen, daß das Gift in irgend eine Verbindung mit im Blute oder in den Organen vorhandenen kolloidalen Substanzen getreten und so unwirksam geworden war. Ein sicherer Beweis für diese Vermutung ließ sich jedoch nicht erbringen. Es wurde versucht, diese hypothetischen Verbindungen durch Säuren zu spalten und das Gift auf diese Weise frei und wirksam zu machen. Wässerige und alkoholische Auszüge aus Blut und den Organen der entnierten Tiere wurden mit verdünnten (5 proz.) Lösungen von Essigsäure, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Salzsäure zum Teil auf dem Wasserbade, zum Teil über freier Flamme unter dem Rückflußkühler in der Dauer von 1 bis 24 Stunden gekocht, die Spaltungsflüssigkeit neutralisiert und sowohl die Vanillinreaktion als die physiologische Wirkung der resultierenden Flüssigkeiten geprüft. Das Ergebnis blieb in allen Fällen ein negatives.

Überblicken wir die Resultate der in dem zweiten Teile unserer Untersuchungen angeführten Versuche, so ergibt sich, daß beim normalen Tiere das Phlorizin bzw. der wirksame Anteil desselben im Blute und in den Organen nachweisbar ist, selbst wenn man den Versuchstieren (Kaninchen) das Gift in kleinen Mengen beibringt, daß es somit unverändert zur Niere gelangt. Dagegen entzieht sich bei nephrektomierten Tieren das Phlorizin in Gaben bis zu 3g im Blute und in der Leber physiologisch und chemisch dem Nachweis. Es geht daraus hervor, daß das Vorhandensein der Niere für das Intaktbleiben des Phlorizins bzw. seines giftigen Bestandteils unbedingt notwendig erscheint. Welche Rolle dabei die Niere spielt, läßt sich aus den bisherigen Versuchen nicht entscheiden. Darüber sollen uns erst weitere Versuche aufklären.

Literatur.

Almagia und Embden, Über die Zuckerausscheidung pankreasloser Hunde nach Alanindarreichung. Diese Beiträge 7, 298 (1906).

R. Cohn, Zur Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 211.

Cremer, Chemische und physiologische Studien über das Phlorizin und verwandte Körper. I. Zeitschr. f. Biol. 36, 115 (1898); II. ebenda 37, 59.

Cremer und Ritter, Phlorizinversuche am Karenzkaninchen. Zeitschr. f. Biol. 29, 236.

Embden und Salomon, Über Alaninfütterungsversuche am pankreaslosen Hunde. Diese Beiträge 5, 507 (1904).

R. Hirsch, Über das Verhalten von Monaminosäuren im hungernden Organismus. Zeitschr. f. exp. Path. u. Therap. 1, 141.

J. Halsey, Über Phlorizindiabetes bei Hunden. Gesellsch. f. Naturwissenschaft. Marburg 1899.

L. Knopf, Beiträge zur Kenntnis des Phlorizindiabetes. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 49, 123 (1903).

F. Kraus, Über die Frage der Zuckerbildung aus Eiweiß im diabetischen Organismus. Berl. klin. Wochenschr. 41 (1904).

Langstein und Neuberg, Über Desamidierung im Tierkörper. Verh. d. physiol. Gesellsch. Berlin 1903.

Lewandowsky, Zur Kenntnis des Phlorizindiabetes. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1901, S. 365.

Löwi, Zur Kenntnis des Phlorizindiabetes. Arch. f. exp. Path. und Pharm. 47, 48.

Lüthje, Die Zuckerbildung aus Eiweiß. D. Arch f. klin. Med. 79, 499 (1904).

v. Mering, Über experimentellen Diabetes. Arch. f. exp. Path. und Pharm. 23, 142 (1887).

Minkowski, Störungen der Pankreasfunktion als Krankheitsursache. Lubarsch-Ostertag, Ergebnisse 1, 69 (1896).

Mohr, Über Zuckerbildung im Diabetes melitus. Zeitschr. f. klin. Med. 52, 337.

Moritz und Prausnitz, Studien über Phlorizindiabetes. Zeitschr. f. Biol. 27, 81 (1890).

F. Müller, Beiträge zur Kenntnis des Mucins usw. Zeitschr. f. Biol. 42, 549.

Nebelthau, Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Zuckerbildung im Tierorganismus. Münchn. med. Wochenschr. 79, 917 (1902).

Pavy, Brodie und Siau, On the mechanism of phlorizin-glycosuria. Journ. of Physiol. 29, 407 (1903).

Simon, Zur Physiologie der Glykogenbildung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 323 (1902).

Yokota, Über die Ausscheidung des Phlorizins. Diese Beiträge 5, 313 (1904).

Zuntz, Zur Kenntnis des Phlorizindiabetes. Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abt. 1895, S. 570.

Verzeichnis der Mitarbeiter des zehnten Bandes.

Baer, J. 80.
Bang, I. 1, 312, 320.
Bauer, F. 345.
Blum, L. 80.
Bohm, V. 1, 312.
Czyhlarz, E. v. 358.
Donath, H. 390.
Embden, G. 265.
Falta, W. 199.
Faubel, O. 35.
Filehne, W. 299.
Fürth, O. v. 131, 174, 188, 358, 462.
Fuld, E. 123.
Ginsberg, W. 411.
Glaessner, K. 473.
Grote, F. 199.
Jerusalem, E. 131, 174.
Knoop, F. 111.
Liefmann, E. 265.
Ljungdahl, M. 1, 312.
Lüthje, H. 265.
Marum, A. 105.
Matter, O. 251.
Moscati, G. 337.
Nürnberg, A. 125.
Oppenheimer, S. 273.
Pauli, W. 53.
Pfeiffer, W. 324.
Pick, E. P. 473.
Pollak, L. 232.
Sasaki, T. 120.
Saxl, P. 447.
Scholl, E. 188.
Schütz, J. 462.
Spiegler, E. 253.
Spiro, K. 277.
Staehelin, R. 199.
Zak, E. 287.

Autorenregister zu Band I bis X.

G.

H.

I.

J.

K.

L.

M.

N.

O.

P.

Q.

R.

S.

T.

U.

V.

W.

Y.

Z.

